

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À MONTRÉAL

EXPRESSION DE PROTÉINES DU ROTAVIRUS HUMAIN CHEZ LES
PLANTES ET LEUR UTILISATION POUR UNE STIMULATION
IMMUNITAIRE CHEZ LA SOURIS.

MÉMOIRE
PRÉSENTÉ
COMME EXIGENCE PARTIELLE
DE LA MAÎTRISE EN BIOLOGIE

PAR
LOUIS-PHILIPPE BERGERON SANDOVAL

DÉCEMBRE 2009

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À MONTRÉAL
Service des bibliothèques

Avertissement

La diffusion de ce mémoire se fait dans le respect des droits de son auteur, qui a signé le formulaire *Autorisation de reproduire et de diffuser un travail de recherche de cycles supérieurs* (SDU-522 – Rév.01-2006). Cette autorisation stipule que «conformément à l'article 11 du Règlement no 8 des études de cycles supérieurs, [l'auteur] concède à l'Université du Québec à Montréal une licence non exclusive d'utilisation et de publication de la totalité ou d'une partie importante de [son] travail de recherche pour des fins pédagogiques et non commerciales. Plus précisément, [l'auteur] autorise l'Université du Québec à Montréal à reproduire, diffuser, prêter, distribuer ou vendre des copies de [son] travail de recherche à des fins non commerciales sur quelque support que ce soit, y compris l'Internet. Cette licence et cette autorisation n'entraînent pas une renonciation de [la] part [de l'auteur] à [ses] droits moraux ni à [ses] droits de propriété intellectuelle. Sauf entente contraire, [l'auteur] conserve la liberté de diffuser et de commercialiser ou non ce travail dont [il] possède un exemplaire.»

REMERCIEMENTS

Au terme de ce travail, j'aimerais exprimer ma profonde reconnaissance à toutes les personnes qui m'ont aidé, orienté et soutenu durant mes années de maîtrise. Je remercie tout particulièrement mon directeur de mémoire, monsieur Fathey Sarhan et mon codirecteur de mémoire, monsieur Denis Archambault, professeurs au Département des Sciences biologiques à l'UQAM. Leur confiance, leur disponibilité et leurs conseils ont permis la réalisation de ce travail. D'autres chercheurs et collègues ont positivement influencé notre recherche. Je pense particulièrement au professeur Francois Ouellet et aux autres collègues de notre laboratoire à savoir: Aurélie Girard, Wilfried Saron, Marie-Claude Saint-Louis et plusieurs autres. Je remercie tous les membres de ma famille pour leurs encouragements, leur soutien psychologique et leur confiance, en particulier mon père Francois Bergeron et ma mère Rosamaria Sandoval. Leurs conseils et leur soutien constants m'ont grandement motivé à entreprendre mes études graduées. À tous les professeurs qui me feront l'honneur de contribuer à l'évaluation de ce travail j'adresse mes gratitude. Ce mémoire s'inscrit dans le cadre d'un projet de recherche concertée sur la santé subventionné par les Instituts de Recherche en Santé du Canada (IRSC) et du Conseil de Recherches en Sciences Naturelles et en Génie du Canada (CRSNG).

TABLE DES MATIÈRES

| | |
|--|-------------|
| LISTE DES TABLEAUX..... | V |
| LISTE DES FIGURES | VI |
| LISTE DES ABRÉVIATIONS | VII |
| RESUME..... | VIII |
| CHAPITRE I – REVUE DE LITTÉRATURE | 1 |
| 1 Introduction..... | 1 |
| 2 Rotavirus humain (RVH) | 1 |
| 2.1 Classification et sérotypage du RVH..... | 1 |
| 2.2 Structure et réplication du RVH..... | 3 |
| 2.3 Infection et pathologie du RVH..... | 5 |
| 2.4 Protection face au RVH | 6 |
| 3 Vaccins contre le RVH..... | 11 |
| 3.1 Vaccins de première génération (Rotashield®, Rotarix® et Rotateq®) | 11 |
| 3.2 Technologie des vaccins végétaux | 13 |
| 3.3 Immunisation mucosale | 15 |
| 3.4 Adjuvant mucosal | 15 |
| L'étude présente..... | 17 |
| CHAPITRE II – ARTICLE SCIENTIFIQUE | 19 |
| 1 Abstract..... | 21 |
| 2 Introduction..... | 22 |
| 3 Materials and method..... | 25 |
| 3.1 Amplification of the native VP7, VP4 and fljB genes..... | 25 |

| | | |
|-----------|---|-----------|
| 3.2 | Generation of rabbit His::VP7 Δ , His::VP4 Δ and His::fljB antisera | 26 |
| 3.3 | Optimization of the VP7 and VP4 coding sequences | 27 |
| 3.4 | Assembly of constructs for expression in plants..... | 27 |
| 3.5 | Agroinfiltration of <i>Nicotiana benthamiana</i> | 28 |
| 3.6 | Leaf sampling and protein extraction..... | 29 |
| 3.7 | Molecular analyses..... | 29 |
| 3.8 | Mice immunization | 30 |
| 3.9 | Assessment of antigen-specific antibody and cellular responses..... | 30 |
| 4 | Results and Discussion..... | 31 |
| 4.1 | Transient expression in <i>Nicotiana benthamiana</i> | 33 |
| 4.2 | Humoral responses in mice | 36 |
| 5 | Acknowledgments | 37 |
| 6 | Table(s)..... | 38 |
| 7 | Captions to illustrations..... | 39 |
| 8 | Illustrations..... | 40 |
| 9 | Supplementary data..... | 43 |
| 10 | Annex..... | 46 |
| | CONCLUSION & PROSPECTIVE..... | 48 |
| | RÉFÉRENCES..... | 52 |

LISTE DES TABLEAUX

| | |
|---|----|
| TABLE 1 : MOLECULAR WEIGHT AND YIELD OF RECOMBINANT PROTEINS IN PLANT EXTRACTS | 38 |
| SUPPLEMENTARY TABLE 1 : PRIMERS USED FOR THE GENERATION OF CONSTRUCTS AND FOR RT-PCR ANALYSES..... | 43 |

LISTE DES FIGURES

| | |
|---|----|
| SCHÉMA 1 : STRUCTURE ET ORGANISATION DU RVH..... | 4 |
| FIGURE 1 : CONSTRUCTS USED FOR EXPRESSION IN TOBACCO LEAVES..... | 40 |
| FIGURE 2 : EXPRESSION OF RECOMBINANT HIS-TAGGED PROTEINS IN <i>E. COLI</i> AND VARIOUS CONSTRUCTS IN <i>NICOTIANA BENTHAMIANA</i> LEAVES | 41 |
| FIGURE 3 : IMMUNOBLOT AND ELISA DETECTION OF HIS-TAGGED RECOMBINANT PROTEINS WITH MICE SERA | 42 |
| SUPPLEMENTARY FIGURE 1 : <i>NICOTIANA BENTHAMIANA</i> PLANTS FOLLOWING AGRO- INFILTRATION | 45 |

LISTE DES ABRÉVIATIONS

ADN : acide désoxyribonucléique

ADN-T : acide désoxyribonucléique transféré

ARN : acide ribonucléique

ARNdb : acide ribonucléique double brin

BSA : albumine de sérum bovin (bovine serum albumin)

CMH : complexe majeur d'histocompatibilité

cpm: compte par minute

CT : toxine du cholera (cholera toxin)

CTL : lymphocytes T cytotoxiques

DMEM : « Dulbecco minimal essential medium »

GFP : protéine verte fluorescente (green fluorescent protein)

HRP : peroxydase du raifort (horseradish peroxidase)

HRV : rotavirus humain (human rotavirus)

LT : entérotoxine « heat-labile »

NSP : protéines non structurales

PBS : (phosphate buffer saline)

PCR : (polymerase chain reaction)

PVDF : polyvinylidene fluoride

RT-PCR : (reverse transcription PCR)

RVH : rotavirus humain

SDS-PAGE : (sodium dodecyl sulfate polyacrilamide gel electrophoresis)

SIgA : immunoglobuline sécrétée de type A

VP : protéines virales structurales

RÉSUMÉ

Au niveau de la santé publique, l'impact meurtrier des infections au rotavirus humain (RVH) et les limites d'application des vaccins disponibles déterminent l'urgence et la nécessité de développer de nouvelles approches pour immuniser une grande partie de la population mondiale sans effets secondaires néfastes. Pour pallier à l'énorme demande en médicaments et en vaccins, plusieurs groupes de recherche tentent de développer de nouvelles méthodes de production à base de plantes transgéniques. La production de médicaments et vaccins chez les végétaux possèdent des avantages inhérents dont une absence de pathogènes humain, une inoculation facile, de faibles coûts de production à grande échelle et la production d'inocula bruts stockables. Le succès des systèmes d'expression à base de plantes justifie le développement de plants qui produisent beaucoup de biomasse et se transforment génétiquement de façon courante. Le travail présenté ici démontre le potentiel du système d'expression transitoire par agroinfiltration de *Nicotiana benthamiana* pour produire les antigènes VP7 et VP4Δ du RVH ainsi que l'adjuvant protéinique fljB de *Salmonella typhimurium*. Le clonage des séquences codantes des antigènes VP7, VP4Δ et fljB a permis de générer de multiples constructions simple, double et triple. Toutes les constructions ont été exprimées dans les feuilles agroinfiltrées à l'exception de VP4Δ::VP7 qui n'a pas été détectée par immunobuvardage. Le rendement de protéines d'intérêt dans les extraits végétaux se situe entre 0,85 et 31,97 µg de protéine recombinante par gramme de feuilles fraîches. Plusieurs facteurs dont la toxicité et la stabilité des différentes constructions dans les plantes peuvent expliquer cet écart. Dans nos conditions expérimentales, toutes les constructions contenant le fragment fljB ont permis la production d'anticorps spécifiques à fljB dans les souris immunisées avec les extraits végétaux. Par contre, aucune construction n'a permis la production d'anticorps spécifiques à VP7 ou VP4. Ces résultats montrent que l'expression transitoire dans *Nicotiana benthamiana* permet de produire rapidement de multiples antigènes et que les protéines fortement immunogéniques dans les extraits végétaux induisent une réponse humorale chez les souris. Plusieurs applications de cette technologie sont envisageables dans le cadre du contrôle endémique du RVH ou de *Salmonella typhimurium*.

Mots-clés : rotavirus humain, VP7, VP4, *Salmonella typhimurium*, fljB, expression transitoire, vaccins à base de plantes, *Nicotiana benthamiana*

CHAPITRE I – REVUE DE LITTÉRATURE

1 INTRODUCTION

Depuis plusieurs années, l'impact économique et social du rotavirus humain (RVH) à l'échelle internationale justifie d'emblée le développement et la mise en place de multiples programmes de vaccination. Le RVH constitue l'agent principal de la diarrhée infantile et des gastroentérites aiguës causant près d'un million de morts mondialement par année (Parashar et al., 2006). Les infections touchent principalement les enfants sous l'âge de cinq ans. La haute prévalence des mortalités dans les pays en voie de développement est attribuée principalement à des soins médicaux inadéquats et au phénomène de malnutrition (Parashar *et al.*, 2006). Aux États-Unis, où les cas de mortalité sont peu importants, le RVH entraîne des coûts annuels d'environ un milliard de dollars en hospitalisation et en dépenses indirectes (Parashar and Glass, 2006).

Afin de développer une stratégie vaccinale polyvalente contre le RVH, plusieurs groupes de recherche se sont concentrés sur la caractérisation du virus : sa classification, sa structure, son mode de réplication, ses composantes majeures et particulièrement le type de réponse immunitaire résultant de l'infection.

2 ROTAVIRUS HUMAIN (RVH)

2.1 Classification et sérotypage du RVH

Les genres *Reovirus* et le genre *Rotavirus* forment la famille des *Reoviridae*. Cette famille de virus affecte une large gamme de vertébrés, d'invertébrés, de plantes

et de bactéries. Les rotavirus se classent en sept sérogroupes de A à G en fonction de la présence d'interactions antigéniques spécifiques. Les groupes de rotavirus D à G infectent uniquement les animaux. Chez les humains, le groupe A constitue l'agent principal des infections à l'échelle mondiale. Les groupes B et C se retrouvent également chez les humains, mais semblent peu importants au point de vue épidémiologique en dehors de la Chine et de l'Inde où ils contribuent à une faible proportion des infections (Barman *et al.*, 2006). Chaque séro groupe se subdivise en plusieurs sérotypes et génotypes selon le système binaire P-G basé sur les protéines externes VP4 et VP7 respectivement (Hoshino and Kapikian, 1996). La ségrégation génétique indépendante des antigènes P et G explique l'existence de plusieurs combinaisons P-G différentes (Santos and Hoshino, 2005). Actuellement, la distribution globale des sérotypes de RVH se détermine grâce aux données de plusieurs études compilées depuis 1989. Selon les données recueillies, quatre souches P-G différentes de rotavirus sont responsables de 88,5% des infections infantiles mondialement (Santos and Hoshino, 2005). Des fluctuations géographiques et temporelles importantes s'observent entre les épidémies induites par les différentes souches. Les souches G1 à G4 dominent sur tous les continents avec une fréquence moyenne de 90% tandis que la souche G9 représente 4,1% des infections globales au RVH. En comparaison, la distribution des souches de types P est plus stable. À l'exception du continent africain où le génotype P[6] représente 30% des souches virales isolées, le génotype P[8] est prédominant et induit avec P[4] 90% des infections mondiales (Santos and Hoshino, 2005). La diversité des souches de rotavirus s'accroît davantage avec l'observation de variations antigéniques au sein d'un même sérotype ou génotype. Les gènes VP4 et VP7 subissent des changements multiples au niveau des séquences et des épitopes neutralisants en fonction du temps (Padilla-Noriega *et al.*, 1998).

2.2 Structure et réplication du RVH

L'architecture moléculaire du RVH fut récemment déterminée par cryomicroscopie électronique et cristallographie aux rayons-X (Dormitzer *et al.*, 2004). La particule virale mature présente un diamètre de 1000 Å et est constituée de trois couches icosahédrales concentriques qui encapsident le génome. Cette triple couche confère aux virions une résistance accrue au pH acide et aux enzymes digestives de l'estomac et du tractus gastro-intestinal (Prasad *et al.*, 2001). Le génome du rotavirus comprend 11 segments d'ARN double brin (ARNdb) qui codent pour six protéines structurales (VP) et six non structurales (NSP). La transcription s'effectue simultanément pour tous les segments d'ARNdb dans le confinement de la particule. L'activité ARN-polymérase ARN-dépendante de VP1 et les fonctions guanylyltransférase et méthyltransférase de VP3 assurent la synthèse des ARNm et les modifications post-transcriptionnelles nécessaires à la traduction dans le cytoplasme de la cellule-hôte (Pesavento *et al.*, 2006). Les transcrits quittent la particule via des canaux qui pénètrent les couches de VP2 et de VP6 de la double capsid. À l'exception de NSP1, les NSP assurent la réplication endogène du virus. Dans le cytoplasme, l'homodimère NSP3 interagit avec le facteur d'initiation de la traduction eIF4G pour faciliter le transport de l'ARNm viral aux ribosomes et stimuler la synthèse des protéines virales. Débute ensuite le processus d'encapsidation où NSP2 et NSP5 initient la formation des viroplasmes périnucléaires et contribuent à l'assemblage des complexes de réplication. Cette étape permet la synthèse des brins négatifs et l'association des segments d'ARNdb nouvellement formés avec leurs complexes VP1-VP3-VP2 respectifs. Des interactions ARN-ARN spécifiques coordonnent la liaison des 12 unités différentes et forment une particule. Cette particule acquiert ensuite la couche de VP6 de la double capsid. Le cycle de réplication se termine avec le bourgeonnement du viroplasma au réticulum endoplasmique où les particules se procurent, avec l'aide de l'entérotoxine NSP4, la couche externe de la capsid

formée de VP7. L'association de VP4 avec la matrice de VP7 s'effectue ultimement dans le cytoplasme avant le relargage des virions dans l'espace intercellulaire (Pesavento *et al.*, 2006).

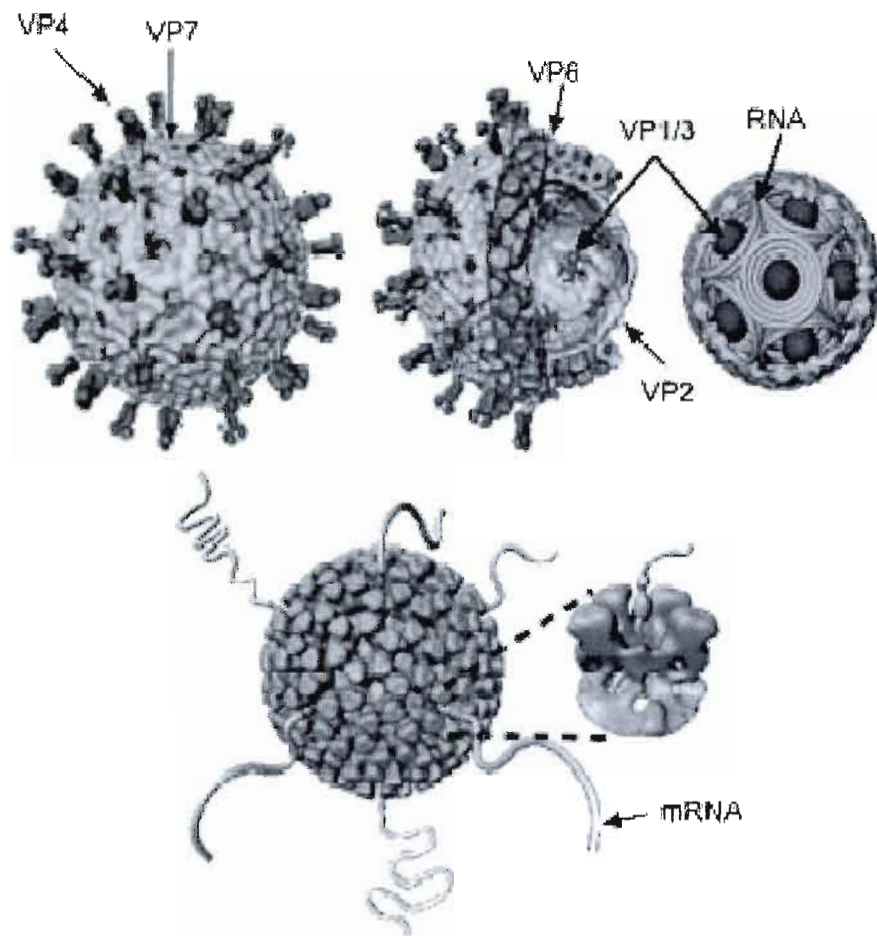


Schéma 1 : Structure et organisation du RVH

Les protéines structurale VP1-2-3-4-6-7 forment le virion qui synthétise son ARNm dans le confinement de la particule (schéma adapté de Pesavento et al., 2006)

2.3 Infection et pathologie du RVH

La transmission du rotavirus s'effectue par la route orofécale. Dans les communautés, les infections au RVH se propagent via les mains, les objets ou les aliments contaminés. Après une période d'incubation de un à trois jours, la maladie se caractérise par des vomissements, des diarrhées liquides et de la fièvre. Les symptômes s'observent habituellement sur une période de quatre à huit jours (Leung et al., 2005). Une personne atteinte du rotavirus sécrète un nombre élevé de particules virales, soit de 10^8 à 10^{10} virions par ml de résidus fécaux. L'excrétion asymptomatique de rotavirus joue également un rôle dans la propagation de la maladie. Les rotavirus sont très stables dans l'environnement et, selon l'incidence des infections, les mesures sanitaires anti-microbiennes semblent être inefficaces dans leur contrôle endémique (Shaw, 2006). En phase initiale de l'infection, les virions attaquent les entérocytes différenciés des villosités localisées dans le jéjunum du petit intestin. La réplication du virus dans les cellules induit en 24 heures un mécanisme d'apoptose intrinsèque (Chaibi *et al.*, 2005) et la libération de l'entérotoxine pléiotropique NSP4 (Ciarlet and Estes, 2001). La destruction subséquente de la structure de l'épithélium cause une diminution de la digestion puis de l'absorption des nutriments et de l'eau, ce qui mène à une déshydratation, une malnutrition de l'organisme puis une inflammation aiguë. Dans certains cas, le RVH échappe au système gastro-intestinal et provoque une virémie où l'ARN et les antigènes viraux peuvent être détectés dans les tissus des enfants et des adultes infectés (Blutt *et al.*, 2003).

Les virions libres de RVH se lient aux cellules gastro-intestinales via les protéines de surfaces de la capside. VP4 et VP7 confèrent au virus son caractère infectieux et son tropisme cellulaire (Pesavento et al., 2006). Le processus d'attachement aux cellules

épithéliales s'entame dans la lumière du petit intestin où les protéases et le pH élevé induisent des changements conformationnels séquentiels qui masquent et exposent différents épitopes de VP4 pour une interaction optimale avec les récepteurs et les molécules à la surface des entérocytes (Pesavento *et al.*, 2006). Ce mécanisme complexe débute avec le clivage trypsine-dépendant des dimères flexibles de VP4 (88 kDa) pour générer les fragments VP8* de 28 kDa (aa 1-247) et VP5* de 60 kDa (aa 248-776). Les deux fragments restent associés avec le virion (Pesavento *et al.*, 2005) et forment une structure pointue et rigide constituée de deux domaines globulaires VP8* distaux et d'un corps central VP5* ancré dans la matrice de VP7 (Monnier *et al.*, 2006). Les pointes dimériques sortent de 10 à 12 nm de la structure virale et permettent la liaison aux cellules cibles, la pénétration, l'hémagglutination et la virulence. Les souches de RVH se lient directement aux intégrines $\alpha v \beta 3$ (Guerrero *et al.*, 2000), $\alpha 4 \beta 7$, $\alpha 4 \beta 1$ et $\alpha 2 \beta 1$ via les motifs DGE (résidus 308-310) et IDA (résidus 538-540) sur VP5* (Graham *et al.*, 2006). Sous un pH élevé, la pointe VP4 déploie les motifs de liaison cellulaire car la structure adopte une forme trilobée qui implique une transition de dimère à trimère et expose les épitopes de VP5* (Pesavento *et al.*, 2005).

2.4 Protection face au RVH

2.4.1 Activation du système immunitaire

Face à une infection au RVH, l'activation du système immunitaire débute suite à la pénétration des virions dans les cellules épithéliales. Les entérocytes infectés sécrètent des chémokines CCL20 et CCL9 ainsi que de l'interleukine-8 qui recrutent les leucocytes puis initient le signal pro-inflammatoire (Casola *et al.*, 2002). Certaines particules et antigènes rotaviraux dans la lumière gastro-intestinale sont également absorbés au niveau des plaques de Peyer iléales ou jéjunales via un processus de

transport actif assuré par les cellules «microplis». Sous l'épithélium associé au follicule, les antigènes viraux sont phagocytés par les cellules dendritiques immatures via des mécanismes de reconnaissance non spécifiques diversifiés. Le système immunitaire s'active initialement via les cellules présentatrices d'antigènes qui reconnaissent des patrons moléculaires associés aux microbes. Cette reconnaissance des antigènes viraux s'effectue via différents récepteurs « toll-like » ; le TLR3 lie l'ARN double-brin du génome viral et le TLR9 reconnaît l'ADN CpG non-méthylé également retrouvé dans les génomes viraux (Wen et al., 2009). *In vivo*, les récepteurs « toll-like » TLR3 et TLR9 jouent un rôle crucial dans la défense contre l'infection au RVH et assurent le lien entre l'immunité innée et adaptative. Leurs ligands induisent la production des cytokines IL-1, IL-8, IL-6, TNF α , IFN α , CCL5 et CCL20 qui recrutent les granulocytes et les cellules dendritiques (Wen et al., 2009). Les cellules dendritiques activées migrent alors vers les follicules associés à la muqueuse et les organes lymphoïdes secondaires où elles expriment plus de molécules du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH). La présentation des épitopes viraux aux cellules T stimule entre autres les cellules-auxiliaires T CD4⁺ naïves à sécréter des cytokines (voir section 2.4.2 ci-dessous) de type T_H1 ou T_H2 (Narvaez et al., 2005; Azevedo et al., 2006). La réponse T_H1 stimule à son tour l'expansion clonale des lymphocytes T CD8⁺ cytotoxiques (CTL) spécifiques au RVH.

2.4.2 Immunité humorale et cellulaire

Chez les humains infectés par le RVH, le niveau supérieur de cytokines T_H2 dans l'intestin révèle l'importance de l'immunité humorale pour une protection contre les symptômes du RVH. Au niveau fonctionnel, les cytokines T_H2 modulent la production d'immunoglobulines (Ig) neutralisantes de types IgG, IgA et IgE. Les plasmocytes muqueux spécifiques au RVH produisent principalement des IgA

classiques et sécrétoires SIgA. Les SIgA constituent la première ligne de défense de la muqueuse et favorisent l'élimination spécifique des pathogènes avant le début de l'infection. Le RVH induit également la production locale T indépendante de SIgA 48h après l'infection (Blutt *et al.*, 2004). Le transport des SIgA dans la lumière intestinale s'effectue majoritairement via les cellules «microplis». Sur les cellules myéloïdes, c'est le récepteur Fc α RI qui module les réponses immunes innées et d'inflammation face aux particules marquées par les IgA. Pour la réponse des cellules B naïves IgD⁺ c'est IL-10 qui induit la production des IgA tandis que chez les cellules B dans le centre germinatif c'est le TGF- β qui promeut la commutation isotypique de IgM à IgA (Azevedo *et al.*, 2006). Chez les enfants la qualité de la réponse humorale antivirale est limitée, car la majorité de leurs lymphocytes B sont CD5⁺ et expriment des récepteurs de cellules B de faible affinité et polyréactifs (Weitkamp *et al.*, 2006).

Dans le cadre d'un modèle porcin d'infection avec la souche rotavirale Wa, les cytokines IFN- γ , IL-12 et IL-8 promeuvent initialement la différenciation et l'expansion clonale des cellules T_{H1} (Azevedo *et al.*, 2006). En parallèle, la sécrétion séquentielle de IL-4 et IL-10 dans la région intestinale induit le développement de la sous-population CD4⁺ T_{H2} et bloque graduellement l'effet activateur du haut niveau de IFN- γ dans le sérum. Ce mécanisme équilibre la double nature T_{H1}-T_{H2} de la réponse immune anti-rotavirale. Le phénomène de coinduction de l'immunité T_{H1} et T_{H2} maintient l'homéostasie immunitaire, facilite le rétablissement de l'organisme et évite des séquelles ou des pathologies induites par un débalancement T_{H1}-T_{H2}. Donc l'induction d'une réponse immunitaire T_{H1}-T_{H2} équilibrée semble être nécessaire pour obtenir un bon corrélat de protection (Azevedo *et al.*, 2006).

2.4.3 Corrélat de protection

Post-infection, c'est principalement la réponse humorale aux épitopes neutralisants dominants des protéines de surfaces de la capsid et une ligne de défense cellulaire CTL mucosale qui confèrent une immunité dans la population. La quantité d'IgA spécifiques au RVH constitue un indicateur fiable d'une immunité protectrice, car les titres d'anticorps neutralisants IgA dans le sérum et de SIgA dans l'intestin sont proportionnellement en corrélation avec le niveau de protection. Un titre de IgA spécifique au RVH supérieur à 1:1800 permet une protection complète face à une diarrhée modérée ou sévère (Franco et al., 2006). La protection est associée à la fonction neutralisante des SIgA spécifiques au RVH qui limitent l'invasion du pathogène, puis à l'action des IgA dans le sérum qui stimulent la réponse inflammatoire lorsque le virus transgresse l'intégrité de la muqueuse (Otten and van Egmond, 2004). L'immunisation par voie orale semble être la plus efficace pour induire une réponse d'anticorps SIgA intestinale, car elle imite la route d'infection naturelle et amplifie la magnitude de la stimulation antigène-dépendante dans l'intestin. Cependant, pour une protection optimale, l'infection ou le régime vaccinal doit absolument générer des populations de lymphocytes B et T mémoires qui résident à long terme dans l'organisme.

2.4.4 Anticorps neutralisants

Les anticorps neutralisants dirigés contre les épitopes de VP4 inhibent principalement les changements de conformation et/ou l'accès des motifs de liaison sur les domaines VP8* et VP5*. La sous unité VP8* présente plusieurs épitopes neutralizants

linéaires et conformationnels spécifiques tandis que la sous unité VP5* contient certains épitopes neutralisants polyréactifs (Monnier *et al.*, 2006).

Pour leur part, les anticorps neutralisants contre les épitopes de la glycoprotéine VP7 bloquent principalement le processus de décapsidation. En effet, l'intégrité structurelle de la matrice de VP7 est calcium-dépendante et le faible niveau de Ca^{2+} dans le cytoplasme cellulaire induit la dissociation des trimères de VP7 (Benureau *et al.*, 2005). Par conséquent, les anticorps qui bloquent les changements de conformation subséquents de VP7 inhibent l'exposition fonctionnelle des complexes de transcription dans la double capsid et neutralisent la réplication des virions (Pesavento *et al.*, 2006). Le fragment VP7 contient trois sites antigéniques majeurs qui rassemblent les épitopes neutralisants dominants de la protéine : la région A (acides aminés 87-99), la région B (acides aminés 145-150) et la région C (acides aminés 211-223). VP7 contient également trois épitopes CTL majeurs aux positions 5-13, 8-16 et 31-40 (Choi *et al.*, 2006b). Plusieurs sites de glycosylation se retrouvent sur VP7 et semblent également influencer le niveau immunogénique de la protéine (Martella *et al.*, 2005).

2.4.5 Immunogénicité des protéines virales

Au niveau du caractère immunogène des différentes protéines virales, c'est VP6 qui contient le plus d'épitopes dominants. Peu importe l'inoculum du RVH, le tissu lymphoïde inducteur ou l'isotype de l'anticorps, VP6 induit un nombre supérieur de plasmocytes. Au second rang, VP4 stimule environ 45% des lymphocytes B actifs spécifiques au RVH. Ensuite, en ordre immunogénique décroissant, on retrouve VP2, VP7, NSP3 et NSP4 (Chang *et al.*, 2001). À l'exception de VP6, c'est la glycoprotéine VP7 qui contient les épitopes immunodominants – restreints aux CMH de classe I K^b , H-2^b et H-2^d – spécifiques à l'activation des CTL (Jaimes *et al.*, 2005).

3 VACCINS CONTRE LE RVH

3.1 Vaccins de première génération (Rotashield®, Rotarix® et Rotateq®)

Depuis plusieurs années, l'impact économique et social du RVH à l'échelle internationale justifie le développement et la mise en place de multiples programmes de vaccination. Les premiers vaccins contre le RVH furent développés dans les années 80 à partir de souches atténuées bovines, humaines et simiennes de rotavirus. Cependant, la nature monovalente de ces vaccins conférait une protection spécifique à un sérotype local et ils furent retirés du marché pour leur manque de polyvalence et d'efficacité dans les différentes régions (Glass and Parashar, 2006).

En 1998, Wyeth Laboratories mis sur le marché Rotashield®, un vaccin oral tétravalent généré par la combinaison de souches humaines et simiennes. La U.S. Food and Drug Administration (FDA) permit l'administration du vaccin aux enfants de deux à six mois (Glass and Parashar, 2006). Cependant, en juillet 1999, le Center for Disease Control (CDC) d'Atlanta recommanda la suspension du vaccin car plusieurs cas d'invagination intestinale (ou intussusception) ont été observés lors du programme de vaccination. Les risques d'intussusception étaient alors évalués à 1:10 000 et en octobre 1999, Rotashield® fut retiré volontairement du marché (Simonsen et al., 2006).

Présentement, seulement deux vaccins multivalent sont en phase initiale de commercialisation. Le vaccin monovalent Rotarix® de Glaxo SmithKline est commercialisé en Amérique du Sud depuis 2005 et en Union Européenne depuis mai 2006. Rotarix® dérive d'une souche humaine G1 atténuée et confère une résistance aux sérotypes G1, G3 et G9 suite à l'administration de deux doses par voie orale aux

enfants de moins de six mois (Ruiz-Palacios *et al.*, 2006). Pour sa part, le vaccin pentavalent Rotateq® de Merck Sharp & Dohme fut approuvé par la FDA et recommandé par le CDC en février 2006 pour les enfants de moins de huit mois. Ce vaccin consiste en la combinaison de souches humaines et bovines et confère une résistance aux sérotypes G1, G2, G3, G4 et P[8] suite à l'administration de trois doses par voie orale (Parashar and Glass, 2006). En juillet 2006, Santé Canada approuva également l'utilisation de Rotateq®.

Malgré leur mise en marché après des tests de sécurité rigoureux et un bon corrélat de protection, les vaccins Rotarix® et Rotateq® présentent les inconvénients et dangers des vaccins classiques reliés à des effets secondaires incertains (Cunliffe and Nakagomi, 2005). Leur application se limite à des patients d'âge précoce et implique certains risques d'interférence avec d'autres vaccins administrés aux jeunes enfants. De plus, leur nature faiblement répliquative et virulente n'exclut pas des complications chez les patients immunodéficients ou susceptibles aux réactions auto-immunes (Glass and Parashar, 2006). Ces restrictions révèlent la nécessité de développer de nouveaux vaccins de seconde génération, plus sécuritaires, à base d'éléments antigéniques purifiés et non réplicatifs qui confèrent une protection sans effet secondaire néfaste. Dans cette optique, la majorité des travaux de recherche prometteurs ont porté sur les protéines de structure rotavirales VP.

En effet, la littérature rapporte l'induction d'anticorps neutralisants spécifiques avec les protéines recombinantes VP6 et VP2 (Saldana *et al.*, 2006), VP4 (Wigdorovitz *et al.*, 2004), VP8* (Kovacs-Nolan and Mine, 2006), VP7 (Li *et al.*, 2006) et NSP4 (Choi *et al.*, 2006c, a). Cependant, les antigènes recombinants sont habituellement moins immunogéniques et nécessitent une coinoculation avec des immunomodulateurs puissants pour induire une immunité protectrice (Ryan *et al.*, 2001).

3.2 Technologie des vaccins végétaux

Parmi les multiples systèmes d'expression disponibles, les plantes transgéniques constituent une technologie de pointe pour exprimer les protéines immunogéniques des pathogènes (Dus Santos and Wigdorovitz, 2005). La production de vaccins chez les végétaux comestibles possèdent plusieurs avantages inhérents dont une absence de pathogènes humain, une inoculation facile, de faibles coûts de production à grande échelle et la production d'inocula bruts stockables (Streatfield and Howard, 2003).

Depuis son développement en 1988, la technique de transformation de plantes via *Agrobacterium tumefaciens* est constamment optimisée pour la production stable et transitoire de protéines exogènes dans plusieurs types de plantes. Ces techniques démontrent un bon rendement de transformation avec une expression fidèle du transgène et une transmission Mendélienne du phénotype transgénique (Somers and Makarevitch, 2004). Lors de leur expression dans les plantes, les protéines recombinantes subissent les modifications post-transcriptionnelles et structurelles typiques du système cellulaire eucaryotique.

Agrobacterium appartient à la famille des *Rhizobiaceae* et constitue l'unique agent naturel capable d'effectuer un transfert d'ADN inter-règne, soit de bactérie à plantes. Les espèces d'agrobactérie employées pour la transformation des plantes possèdent toutes un plasmide Ti « tumor inducing » désarmé. Brièvement, le processus de transfert de l'ADN-T s'effectue sous le contrôle des gènes de virulence (vir) compris dans le plasmide Ti. Différentes tâches sont alors accomplies par les 30 gènes vir connus, comme la formation de la structure de liaison bactérie-plante (virB), l'excision et traitement de l'ADN-T (virD, virC) ou la protection de l'ADN-T lors du transfert (virE). La régulation de l'expression des gènes vir est assurée principalement

par le récepteur kinase VirA et la phosphorylation du facteur de transcription VirG. VirG lie directement les séquences d'ADN nommées boîtes vir et induit la transcription (Pappas, 2008). L'expression stable ou transitoire du transgène se détermine principalement en fonction du type de cellule transformée, germinales ou somatiques. Plusieurs techniques permettent l'infection de tissu végétal avec *Agrobacterium tumefaciens* pour une expression transitoire. Le système d'agro-infiltration consiste à forcer la suspension bactérienne dans l'espace extracellulaire du tissu foliaire et présente une rapidité de transformation et une productivité sans parallèle (Giritch *et al.*, 2006).

3.2.1 Vaccins végétaux anti-RVH

Les travaux antérieurs sur le RVH ont démontré que l'administration orale de vaccins végétaux non purifiés sous forme de nourriture peut stimuler une réponse immunitaire et même conférer une protection. À titre d'exemple, une protection et une immunité lactogénique contre le rotavirus bovin ont été induites avec succès à l'aide d'un vaccin peptidique comestible (Wigdorovitz *et al.*, 2004). Cette stratégie impliquait l'expression constitutive de l'épitope eBRV4 de VP4 en fusion avec le gène rapporteur β -glucuronidase dans des plants de luzerne transgéniques. D'autre part, une immunité passive au rotavirus simien fut conférée suite au gavage de souris gravides avec des extraits de luzerne transgénique exprimant la protéine VP6 et l'adjuvant CpG (Dong *et al.*, 2005). Une autre étude a confirmé que les protéines VP2 et VP6 exprimées dans des tomates transgéniques possèdent un poids moléculaire et une conformation immunogénique fonctionnelle similaires aux protéines sauvages (Saldana *et al.*, 2006). L'expression stable de la protéine VP7 de la souche Wa dans la pomme de terre, a été confirmée sur 50 générations et ce, sans changement de la capacité immunogénique (Li *et al.*, 2006).

3.3 Immunisation mucosale

L'immunisation par voie orale semble être la voie la plus efficace pour induire une réponse d'anticorps SIgA intestinale car elle imite la route d'infection naturelle et amplifie la magnitude de la stimulation antigène-dépendante dans l'intestin. Cependant, pour une protection optimale, l'infection ou le régime vaccinal doit absolument générer des populations de lymphocytes B et T mémoires qui résident à long terme dans l'organisme. Chez l'humain, la lumière gastro-intestinale constitue un environnement complexe et riche en microorganismes ainsi qu'en antigènes différents. Pour ne pas induire une tolérance orale et se distinguer des substances inoffensives et des nutriments, les vaccins mucosaux doivent activer les voies de signalisation innées. Plusieurs récepteurs de reconnaissance non spécifiques, comme les récepteurs « toll-like » (TLR), permettent au système immunitaire de distinguer les antigènes, pathogènes et vaccins introduits via les surfaces mucosales.

3.4 Adjuvant mucosal

Pour conférer une protection face aux charges virales standard de 4×10^5 FFU (focus-forming units) lors d'une infection au RVH (Azevedo *et al.*, 2006), le vecteur vaccinal doit inclure un adjuvant mucosal. Les meilleurs adjuvants mucosaux connus sont les entérotoxines CT (Cholera toxin) de *Vibrio cholerae* et LT (heat-labile enterotoxin) d'*Escherichia coli*. Ces toxines induisent de hauts niveaux de SIgA et stimulent les CTL lorsqu'ils sont administrés comme adjuvant. Des mutants non toxiques de LT et CT ont été développés pour permettre d'induire des réponses immunes de type Th1 et Th2 avec les sous-unités A ou B des deux toxines (Yuan *et al.*, 2005). Dans le cas des vaccins comestibles, Choi et collaborateurs (2005) ont démontré la possibilité d'exprimer dans un système végétal un antigène rotaviral en fusion avec un adjuvant. Ils ont transformé des plants de pommes de terre avec un

gène chimérique de la protéine VP7 du rotavirus simien en fusion avec la sous-unité B de la toxine du choléra (Choi et al., 2005) ou la sous-unité B de la toxine du ricin (Choi et al., 2006b). Par contre, par leur nature toxique et dommageable, l'emploi des toxines de *V. cholerae*, de *E. coli* et des autres pathogènes n'est pas envisageable chez l'homme (Neutra and Kozlowski, 2006).

Dans ce domaine de recherche, de nouvelles approches sont basées sur le potentiel adjuvant des sous unités fliC et fljB de flagellines de *Salmonella*. Malgré certaines limites d'application, comme une séroprévalence élevée chez l'humain, le manque d'adjuvants protéiniques au niveau mucosal fait en sorte que l'utilisation de la flagelline mérite d'être explorée (Huleatt et al., 2007). Spécifique à *Salmonella* et présent dans quatre des six sous-espèces *enterica*, le gène fljB constitue un candidat de choix pour l'expression en fusion avec l'antigène viral (Cuadros et al., 2004; Huleatt et al., 2007). Les motifs terminaux conservés sur la protéine fljB lient les récepteurs TLR5 de plusieurs types cellulaires au niveau des plaques de Peyer de l'épithélium intestinal (Murthy *et al.*, 2004). Ce contact induit la translocation à travers l'épithélium puis la migration, l'activation et la maturation des cellules présentatrices d'antigènes (Means *et al.*, 2003). TLR5 est un récepteur transmembranaire qui active le facteur de transcription pro-inflammatoire NK- κ B et induit l'expression de gènes pro-inflammatoires (Simon and Samuel, 2007). Plusieurs voies de signalisation sont impliquées dans la transduction du signal pro-inflammatoire dont les voies de la protéine kinase activée par les mitogènes (MAPK), de la protéine kinase activée par le stress (SAPK) et de la kinase I κ B (IKK) (Tallant et al., 2004). L'expression subséquente des gènes du CMH de classe I/II et de B7.2 sur les cellules présentatrices d'antigènes favorisent la stimulation des réponses humorale et cellulaire potentiellement protectrices (Pino et al., 2005). FljB stimule également les cellules dendritiques à sécréter des chémokines et des cytokines pro-inflammatoires comme IL-6 et TNF- α (Means *et al.*, 2003). Quelques exemples

confirment le potentiel adjuvant de la flagelline comme partenaire de fusion avec des protéines faiblement immunogéniques comme la protéine fluorescente verte (GFP) (Cuadros et al., 2004; Huleatt et al., 2007).

L'ÉTUDE PRÉSENTE

Le développement d'un programme de vaccination efficace implique la mise au point d'une stratégie ubiquitaire qui intègre tous les facteurs essentiels – vecteurs d'inoculation, antigènes et adjuvants – pour l'induction d'une immunité protectrice spécifique au RVH. Notre projet de recherche consiste à développer une stratégie vaccinale combinatoire à base d'antigènes viraux non réplicatifs. L'approche hétérologue proposée emploie deux vecteurs d'inoculation différents, soit des adénovirus recombinants non réplicatifs pour les immunisations primaires et des plantes transformées pour les doses de rappel. L'étude présente fait uniquement appel au volet des plantes recombinantes. Ce projet de maîtrise vise à développer des plants de tabac exprimant les antigènes VP4 et VP7 de la souche rotavirale Wa en fusion avec l'adjuvant mucosal fljB. Plusieurs combinaisons chimériques des antigènes VP4, VP7 et fljB ont été exprimées de façon transitoire dans l'espoir d'obtenir une conformation immunogénique optimale et cibler la production massive des protéines recombinantes dans des feuilles de tabac. Pour les analyses d'immunogénicité, les protéines recombinantes sont premièrement injectées par voie sous-cutané pour évaluer la réponse humorale systémique avant de tester l'induction de l'immunité mucosale par voie orale. Les diverses constructions VP7, VP4Δ, fljB, VP7::VP4Δ, VP4Δ::VP7, VP7::fljB, VP4Δ::fljB et VP4Δ::VP7::fljB ont démontré un niveau d'expression et une immunogénicité variable. Le régime d'immunisation appliqué aux souris BALB/c a permis de déterminer la production d'anticorps spécifiques aux antigènes du RVH et/ou de *Salmonella typhimurium*. Dans nos conditions expérimentales, toutes les constructions contenant le fragment fljB ont permis la

production d'anticorps spécifiques à fljB dans les souris immunisées avec les extraits végétaux. Par contre, aucune construction n'a permis la production d'anticorps spécifiques à VP7 ou VP4. Les tests d'immunogénicité par voie orale n'ont pas été effectués à cause du niveau faible d'expression des protéines chimériques. Différentes techniques de biologie moléculaire, de biochimie et d'immunologie ont été utilisées, et les résultats obtenus font l'objet d'un manuscrit qui a soumis été soumis pour publication.

CHAPITRE II – ARTICLE SCIENTIFIQUE

PRODUCTION OF HUMAN ROTAVIRUS AND *SALMONELLA* ANTIGENS IN PLANTS AND ELICITATION OF FLJB-SPECIFIC HUMORAL RESPONSE IN MICE

Louis-Philippe Bergeron-Sandoval¹, Aurélie Girard¹, François Ouellet¹, Denis Archambault¹ and Fathey Sarhan^{1*}

¹ Université du Québec à Montréal, Département des Sciences biologiques, CP 8888 Succ. Centre-ville, H3C 3P8, Canada

Cet article a été soumis au journal *Vaccine* le 21 octobre 2009.

J'ai été impliqué dans toutes les facettes des travaux associés à cet article. J'ai participé à l'élaboration du design expérimental et effectué toutes les manipulations au laboratoire ainsi que toutes les analyses. J'ai finalement rédigé la première version du manuscrit et conçu les figures. Aurélie Girard a également participé à l'élaboration du design expérimental des immunisations. De plus, elle a effectué l'amplification par RT-PCR des gènes natifs VP7 et VP4 et a activement participé aux expériences d'immunisation des souris avec les extraits végétaux. Les membres de mon comité de direction ainsi que les coauteurs de cet article, Fathey Sarhan, Denis Archambault et François Ouellet ont tous participé à l'élaboration du projet et du design expérimental, ainsi qu'à l'interprétation des résultats. De plus, ils ont supervisé la rédaction du manuscrit

PRODUCTION OF HUMAN ROTAVIRUS AND *SALMONELLA* ANTIGENS IN
PLANTS AND ELICITATION OF FLJB-SPECIFIC HUMORAL RESPONSE IN
MICE

Louis-Philippe Bergeron-Sandoval¹, Aurélie Girard¹, François Ouellet¹, Denis Archambault¹ and Fathey Sarhan^{1*}

¹ Université du Québec à Montréal, Département des Sciences biologiques, CP 8888
Succ. Centre-ville, H3C 3P8, Canada

This work describes the efficient use of a *Nicotiana benthamiana* transient expression system to produce several combinations of proteins from rotavirus and *Salmonella*. Our data show that a plant-expressed *Salmonella* flagellin can trigger an immune response in mice. This is a first step towards the development of plant-based vaccines against enteric pathogens.

Section of publication: Regular paper

*Corresponding author: Professor Fathey Sarhan

Département des Sciences biologiques
Université du Québec à Montréal
CP 8888 Succ. Centre-ville
Montréal, Québec, H3C 3P8
Canada

Phone : +1 (514) 987-3000 ext 3363
Fax : +1 (514) 987-4647
E-mail : sarhan.fathey@uqam.ca

1 ABSTRACT

A *Nicotiana benthamiana* transient expression system was used to express single antigen and dimeric combinations of the human rotavirus (HRV) immunogens VP7 and VP4 Δ proteins fused with *Salmonella typhimurium*'s fljB subunit flagellin as an adjuvant. Immunoblot analyses using rabbit antibodies generated against these proteins demonstrated that the constructs were successfully expressed with yields ranging from 0.85 to 31.97 μ g of recombinant protein per gram of fresh leaf tissue. Expressing the single and dimeric antigens has no effect on plant growth and development. Immunization of mice with proteins from leaves transformed with constructs bearing the fljB moiety elicited fljB-specific serum IgGs. These results demonstrate the potential of generating a *Salmonella typhimurium* subunit vaccine in plants. In addition, the work describes the efficacy of using a *Nicotiana benthamiana* transient system in expressing multiple combinations of pathogen proteins.

Key words: enteric pathogens, plant-based vaccines, transient expression

Running headline: Production of antigens in *Nicotiana benthamiana*

2 INTRODUCTION

The World Health Organization (WHO) estimates the death toll from diarrheal diseases at nearly 1.9 million deaths per year. Young children are at particular risk especially in developing countries. Furthermore, untreated early childhood diarrheal diseases were found to impair growth, physical and cognitive development, which may later decrease human potential and productivity (Guerrant et al., 2002). The most common enteric pathogens are adenoviruses, astroviruses, human caliciviruses, rotaviruses, *Campylobacter jejuni*, toxigenic *Escherichia coli*, *Salmonellas*, *Shigellas* and *Vibrio cholerae*. The wide diversity of bacterial and viral enteric pathogens that cause diarrhea and gastroenteritis is a serious challenge for proper etiological diagnostic and development of treatments (Girard et al., 2006). Epidemiological surveys on enteric pathogens in various regions of the world confirmed that 70% of diarrheal diseases are foodborne (Buzby and Roberts, 2009).

Salmonella is one of the most common bacterial foodborne pathogen (Galanis et al., 2006). The WHO mainly supports international foodborne disease surveillance through the WHO Global Salm-Surv public health databank dedicated to monitor the distribution of *Salmonella* serotypes and outbreaks worldwide. Of people infected by *Salmonella* in the United States each year, an estimated 1.4 million require medical attention. *Salmonella typhimurium*, a causal agent of gastroenteritis in humans, is the second most frequent strain found in humans since 1990 (Galanis et al., 2006). This serovar is a host-generalist that infects a wide range of animals and is the major cause of food poisoning resulting from consumption of infected meat or poultry. The currently available vaccine, Poulvac ST (Fort Dodge Animal Health Inc, Overland Park, KS)[®], is used to reduce *Salmonella enteritidis* infection in chickens. However, consumption of food products derived from vaccinated poultry could still raise health concerns. The use of a vaccine generated from disarmed live pathogens presents

some risks like reversion to virulence or hypersensitive immune responses to vaccine components. A *Salmonella typhimurium* subunit vaccine would thus represent a safe alternative. Flagellin, a component of bacterial flagella, has been identified as a pathogen-associated molecular pattern (PAMP) that is recognized by the defence system in all eukaryotes. *Salmonella* expresses two flagellin proteins, fliC and fljB known as strong immunological elicitors (Parashar et al., 2006). Expression of these proteins to generate subunit vaccines could thus be of particular interest for both epidemic salmonellosis disease control and adjuvant technology.

Rotaviruses are the leading cause of diarrheal viral diseases (Massis et al., 2008). The Global Alliance on Vaccines and Immunizations (GAVI) identified a rotavirus vaccine as one of the top three priority vaccines for international development (Parashar and Glass, 2006). The human rotavirus (HRV) is a highly infectious agent causing infections that range from asymptomatic to severe dehydrating gastroenteritis, often resulting in hospitalization and sometimes death. Transmission of the virus is mostly fecal-oral but some studies have reported evidence for possible spread via the respiratory tract (Azevedo et al., 2006). HRV is a triple layered icosahedral particle with two surface structural proteins that determine the serotypes. The G type is determined by the antigenic diversity of the VP7 glycoprotein and the P type is determined by the diversity of the VP4 protein (Hoshino and Kapikian, 1996). The HRV peculiar structure causes a complex epidemiological pattern. This is exacerbated by the fact that temporal and geographical fluctuations allow multiple strains to circulate simultaneously in a given population (Santos and Hoshino, 2005). The infectivity of HRV is dependent on the trypsin-like treatment of the viral particle. In the gastrointestinal tract, the conformation of the flexible minor outer capsid VP4 is altered by proteolytic cleavage and high pH, which results into polypeptides VP8* and VP5*. This cleavage allows early virus-cell interactions, cell binding, entry, hemagglutination, and

neutralization (Monnier et al., 2006). Sequence analysis of VP4 in neutralization escape mutants suggested that the strain-specific neutralization epitopes are localized in the VP8* subunit (Pesavento et al., 2005). In contrast, the cross-reactive neutralization domains appear to be localized in the VP5* subunit. The major outer capsid protein VP7 also contains dominant neutralizing epitopes for virus attachment to the host cell membrane and decapsidation process (Pesavento et al., 2006). In addition, VP7 is the dominant target protein for rotavirus-specific cytotoxic lymphocyte activity (Choi et al., 2006b). Therefore, VP7 and VP4 were chosen by many investigators as candidate antigens for subunit vaccine development. Current mono- and multivalent vaccines against HRV are very expensive, and limited by their formulation and manufacturing (Cunliffe and Nakagomi, 2007). Problems associated with the use of these vaccines are hypersensitivity to their components and the possible induction of intussusception or intestinal malformations (Simonsen et al., 2006). In addition, they are not recommended for immunocompromised infants, infants with pre-existing chronic gastrointestinal conditions, and infants beyond 12 weeks of age at the time of first immunization (Glass and Parashar, 2006). The availability of a safe, effective and affordable rotavirus vaccine would thus represent a global public health breakthrough. A critical aspect of the immunization strategy against HRV must involve the generation of a vaccine possessing the ability to generate heterotypic immunity.

Plants have been increasingly explored for the production of biomedicines and vaccine components. The edible vaccine technology offers an alternative to the traditional approaches used for immunization, particularly in the developing world where storing and administering vaccines are often major problems. Vaccines delivered orally increase safety measures by eliminating the need for needles. In addition, biosafety concerns are eliminated since plant pathogens do not replicate in animals and humans. Plants are thus an attractive production platform for

recombinant vaccines because of their rapid engineering, low cost, high safety and scalability (Streatfield and Howard, 2003). Also of interest is the fact that edible vaccines target mucosae, which is essential to achieve stimulation of both the systemic and the mucosal immune networks. Mucosal immune responses represent a first line of defense against most enteric pathogens, as they are essential to block the bacteria or virus in the gut prior to epithelial cell infection (Otten and van Egmond, 2004).

In this report, various rotavirus VP7 and VP4 antigens and *Salmonella* fljB flagellin fusion constructs were generated and expressed in plants. Our data demonstrate the feasibility of producing a *Salmonella* subunit vaccine in plants. In addition, the work describes the efficacy of using a *Nicotiana benthamiana* transient system in expressing multiple combinations of pathogen proteins.

3 MATERIALS AND METHOD

3.1 Amplification of the native VP7, VP4 and fljB genes

MA104 cells were maintained in Dulbecco minimal essential medium (DMEM) with 5% (v/v) fetal bovine serum. For cell infection, the G1P1A[8] serogroup of the human rotavirus Wa strain was incubated for 30 minutes at 37°C in DMEM supplemented with 10 µg/ml porcine pancreatic trypsin (Sigma-Aldrich) then confluent 2-day old MA104 cultures were inoculated with the activated viruses. The viral titers were determined and calculated as the median tissue culture infective dose (TCID₅₀) per ml (Archambault et al., 1988). The infected cells were further incubated in serum-free DMEM containing 5 µg/ml porcine pancreatic trypsin until 90% of the cells exhibited a cytopathic effect. After three freeze/thaw cycles, the cell

culture supernatant were collected by centrifugation for 15 minutes at 3000 x g at 4°C. The rotavirus genomic RNA was extracted from the supernatant using TRIzol® Reagent (Invitrogen) and was reverse-transcribed to complementary DNA (cDNA) using random hexadeoxyribonucleotides (pd(N)6; GE Healthcare), as previously described (Kang et al., 2001). The cDNAs corresponding to VP7Δ (amino acids 84 to 332) and VP4Δ (amino acids 1 to 336) were then amplified by PCR using specific primers (Supplementary Table1) for cloning in various vectors.

Genomic DNA from the *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium* SL1344 strain was extracted by alkaline lysis of the bacterial culture and the *fljB* gene was amplified by PCR using specific primers (Supplementary Table 1). The amplified products coding for VP7Δ, VP4Δ and *fljB* were cloned into pBluescript/KS+ (pBS) vector (Stratagene) and confirmed by sequencing (McGill University and Génome Québec Innovation Centre, Montreal, Canada).

3.2 Generation of rabbit His::VP7Δ, His::VP4Δ and His::fljB antisera

To produce recombinant proteins for antibody generation in rabbit, the native VP7Δ, VP4Δ and *fljB* cDNAs were cloned into the pTrcHisB expression vector (Invitrogen) to generate N-terminal (His)₆-tagged fusions. These constructs were used to transform DH5α *E. coli* cells by heat shock, and recombinant protein expression was induced with 1 mM IPTG for 5 hours. Proteins were purified on Ni-NTA-His-Bind® resin (Novagen) under denaturing conditions according to the manufacturer's manual. The purified His::VP7Δ, His::VP4Δ and His::fljB proteins were dialyzed against phosphate-buffered saline (PBS) (pH 7.3), then quality was assessed by SDS-PAGE and immunoblotting using an HRP-coupled goat anti-His antibody (1:20,000) (QIAGEN) with the Western Lightning® chemiluminescence reagent (Perkin-Elmer). The identity of the proteins was confirmed by MALDI time-of-flight tandem mass

spectrometry (McGill University and Génome Québec Innovation Centre), using the MASCOT software (Matrix Science). Protein concentrations were determined with the Bio-Rad Protein Assay[®] Kit (Bio-Rad). Polyclonal antibodies were raised by immunizing New Zealand white rabbits with the purified proteins according to standard procedures.

3.3 Optimization of the VP7 and VP4 coding sequences

To ensure optimal expression in plants, the coding sequences of the full-length VP7 (GenBank accession no. AAA47342) and VP4 (acc. no. AAA66953) from the human rotavirus Wa strain were optimized for codon usage in dicotyledonous plants and chemically-synthesized (GeneArt, Regensburg Germany). We also modified a number of sequences that may destabilize mRNA, and mutated endonuclease restriction sites XbaI, SacI and EcoRI when present.

3.4 Assembly of constructs for expression in plants

Constructs VP7, VP4 Δ , fljB, VP7::VP4 Δ , VP4 Δ ::VP7, VP7::fljB and VP4 Δ ::fljB (Figure 1) were generated using the optimized full-length VP7 and truncated VP4 Δ sequences, and the native fljB sequence. Fragments were amplified by PCR using specific primers (Supplementary Table 1) and cloned individually in pBluescript/KS+. Restriction digests were used for ligation of the fragments to form the various dimeric combinations. The flexible hinge peptide GSAT was included between the various moieties to facilitate proper protein folding and maximize antigenicity. The single and dimeric sequences were then cloned into the pRTL2 vector (Restrepo et al., 1990), in an expression cassette consisting of the cauliflower mosaic virus double 35S promoter, the tobacco etch virus 5' untranslated leader

sequence, a 3' translated SEKDEL in frame sequence (endoplasmic reticulum retention signal) and the CaMV 35S transcription terminator. All constructs were confirmed by sequencing. The plant expression vectors were generated by the insertion of each expression cassette in the PstI site of pCambia1380.

3.5 Agroinfiltration of *Nicotiana benthamiana*

Nicotiana benthamiana plants were grown from seeds in a 1:1:1 mixture of black earth, ProMix and vermiculite. Growth chambers were set at a temperature regime of 25°C day / 21°C night with a 16-hour photoperiod. After two weeks, plantlets were potted individually and grown under the same conditions for two additional weeks.

For transient expression assays, the pCambia constructs were first electroporated in *Agrobacterium tumefaciens* strain AGL1. *Agrobacteria* were grown in LB medium containing ampicillin and tetracyclin until they reached an OD₆₀₀ of 0.8. *Agrobacteria* suspensions were centrifuged and resuspended in the MMA infiltration medium (Kane et al., 2007) containing 20 µM acetosyringone. Each suspension was mixed 1:1 with a suspension of *Agrobacteria* carrying the P19 suppressor of post-transcriptional gene silencing to enhance transient expression of the heterologous constructs. Cultures were incubated 2 hours at room temperature, then infiltrations were done on the lower side of leaves. Plants were covered with a protective hood and returned to the growth chamber for 24 hours. Hoods were removed and plants were grown up to 10 days before being harvested. Plants at various developmental stages at the time of infiltration and various post-infection conditions were tested to determine the optimal conditions for maximal protein accumulation.

3.6 Leaf sampling and protein extraction

Aerial parts of the plants were harvested, frozen in liquid nitrogen and ground into a fine powder. Proteins were extracted and precipitated with the trichloroacetic acid (TCA)-acetone method (Mechin et al., 2007) with some modifications. The powder was homogenized in cold acetone containing 10% TCA 0.07% 2-mercapto-ethanol. After precipitation at -20°C, the pellet was recovered by centrifugation and washed at least 3 times with cold acetone until the supernatant was colorless. The final pellet was dried to remove traces of acetone and proteins were solubilized in PBS containing 8 M urea. Slurries were centrifuged at 17,000 x g for 20 minutes and the supernatant was dialyzed against a series of PBS solutions containing decreasing urea concentrations. Proteins were concentrated 20-fold by ethanol precipitation (80% v/v final concentration), solubilized in water and stored at -80°C.

3.7 Molecular analyses

For immunoblot analyses, proteins were separated on 12% SDS-polyacrylamide gels and transferred onto PVDF membranes. Blots were blocked with PBS-Tween 20 (0.05 % v/v) containing 5% (w/v) powdered skimmed milk, then incubated with the rabbit anti-His::VP7Δ (1:5000), anti-His::VP4Δ (1:5000) or anti-His::fljB (1:20,000) antibodies. Detection was performed with an HRP-coupled goat anti-rabbit-IgG antibody (1:15,000; Santa Cruz Biotechnology) and the Western Lightning® chemiluminescence reagent (Perkin-Elmer). To determine the levels of proteins expressed in the infiltrated plants, immunoblots of different dilutions of plant and bacterial samples were analyzed by densitometry of the X-ray films with the Quantity One software (Bio-Rad).

For RT-PCR analyses, total RNA was isolated from agro-infiltrated *Nicotiana benthamiana* leaves using the TRIzol Reagent (Invitrogen), then reverse-transcribed using SuperScript II Reverse Transcriptase (Invitrogen). The transgene transcripts were amplified by PCR using specific primers (Supplementary Table 1), and analyzed by electrophoresis on 0.8% agarose/ethidium bromide gels.

3.8 Mice immunization

Six-week-old female BALB/c mice were obtained from Charles River Canada. Groups of 8 mice were immunized subcutaneously with 50 μ l of each concentrated extract emulsified with an equal volume of Stimune™ adjuvant (Cedi Diagnostics). Since the expression level and solubility varied between the target proteins, the maximum quantity of protein administered per dose varied between extracts: VP7 (0.425 μ g), VP4 Δ (2.5 μ g), fljB (2.025 μ g), VP7::fljB (15.985 μ g) and VP4 Δ ::fljB (6.125 μ g). An extract of plant-expressed green fluorescent protein was used as a negative control. Booster immunizations were administered 17 days and 34 days following primary immunizations. Blood samples were collected at 48 days, then sera were stored at -80°C.

3.9 Assessment of antigen-specific antibody and cellular responses

Humoral response in mice was assayed by immunoblot, indirect immunofluorescence and indirect ELISA analyses of sera. For immunoblot analysis, 0.25 to 2 μ g of each His-tagged recombinant protein (VP7 Δ , VP4 Δ or fljB) was separated on 12% gels, transferred onto PVDF membranes and probed with each pooled mouse serum (1:1000). Signals were detected as described above.

For indirect ELISA (enzyme linked immunosorbent assay) analysis, high binding Costar 96-well plates (Corning) were incubated overnight with 1 µg per well of fljB recombinant protein. Plates were then blocked with PBS Tween 0.2% BSA 0.5%, incubated with each pooled mouse sera for 2 hours, washed with PBS Tween 0.2%, and incubated with secondary HRP-coupled goat anti-mouse IgG-Fc antibody (1:10,000) (Bethyl Laboratories). Detection was achieved with 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine (TMB) dihydrochloride according to the manufacturer's procedure (Sigma). One hour after adding the reagents, the reactions were stopped with 0.2 M sulphuric acid and plates were read at 655 nm. A signal was considered positive when the mean value of the duplicates was 2-fold higher than the GFP control group. This experiment was repeated twice.

4 RESULTS AND DISCUSSION

Towards the development of a plant-based vaccine against enteric pathogens, various single antigen and multiple antigen combinations of the VP7 and VP4 HRV antigens, and the *Salmonella* fljB flagellin were expressed in a *Nicotiana benthamiana* transient expression system. To evaluate the expression levels, recombinant proteins were expressed in *E. coli* and antibodies were generated.

The recombinant His-tagged VP7 coding sequence was found to be toxic to *E. coli* (data not shown), as previously reported (Choi et al., 2006b). Alternatively, the truncated VP7Δ fragment was selected on the basis of antigenicity index and surface probability analyses. This fragment bears the three major antigenic sites containing dominant neutralization epitopes, designated A (amino acids 87-99), B (amino acids 145-150) and C (amino acids 211-223) (Choi et al., 2006b). The truncated His::VP7Δ

protein was successfully expressed as a 31 kDa recombinant protein (Figure 2A) at a yield of 4 mg per liter of bacterial culture.

A truncated fragment of the 776 amino acids VP4 protein was generated to reduce the length of transcript and recombinant protein and thus facilitate expression. The selected VP4 Δ region contains the VP8* subunit that presents linear and conformational neutralizing epitopes (Monnier et al., 2006), the cleavage site between the VP8* and VP5* subunits, and the amino-terminal region of VP5* containing the DGE sequence motif essential for virus attachment to target cells (Graham et al., 2006). The 41 kDa His::VP4 Δ protein was produced as a homogeneous, soluble protein at a yield of 2 mg per liter of bacterial culture (Figure 2A).

Sequence alignment of various fljB genes from distinct types and strains of *Salmonella* identified two conserved domains at the NH₂ and COOH termini (McQuiston et al., 2004) known to trigger PAMP recognition pathways (Heese et al., 2007). We therefore cloned a DNA fragment encoding a 300 amino acids fljB protein containing these conserved domains from *Salmonella typhimurium*. Our data confirmed the expression of a 53 kDa His-tagged fljB protein in *E. coli* with a yield similar to the His::VP7 Δ and His::VP4 Δ proteins (Figure 2A).

The recombinant His-tagged VP7 Δ , VP4 Δ and fljB proteins were used to raise antibodies in rabbits. Sera of immunized rabbits contained high titers of specific antibodies that recognize recombinant proteins produced in both *E. coli* (data not shown) and transformed plants (Figure 2C). This demonstrates that the protein fragments selected are able to generate an immune response in animals.

4.1 Transient expression in *Nicotiana benthamiana*

Coding sequences of the VP7 and VP4 genes were optimized for codon usage and expression in dicotyledonous plants. The synthetic genes encode protein sequences identical to those encoded by the native VP7 and VP4 genes. The individual synthetic full length VP7, truncated VP4 Δ and native fljB sequences were assembled into various combinations, namely VP7::VP4 Δ , VP4 Δ ::VP7, VP7::fljB and VP4 Δ ::fljB (Figure 1). Each single and dimeric coding region was fused to the 5' untranslated region of the tobacco etch virus, which stabilizes mRNAs on ribosomes and accentuates transcription.

To rapidly produce high amounts of proteins in plants, constructs were transiently expressed in *Nicotiana benthamiana*. The agro-infiltration technique allows protein expression in leaves infected with *Agrobacterium tumefaciens* carrying the various constructs. We investigated the expression of the single antigen and multiple antigen combinations. Accumulation of the antigens is not toxic to plants except for constructs VP7 and VP4 Δ ::VP7, which show mild toxicity after 48 hours of infection (Supplementary figure 1). In these cases, leaves were harvested before the appearance of toxic symptoms.

RT-PCR analyses confirmed the expression of all constructs in the infiltrated leaves (Figure 2B). Specific amplification products were obtained for each construct, whereas no signal was detected from mock-transformed plants (data not shown). Transiently-expressed proteins were also found in all transformants except for the VP4 Δ ::VP7 construct (Figure 2C). Molecular masses of the expressed proteins correspond to those predicted from the corresponding genes. The yield of expressed proteins ranged from 0.85 to 31.97 μ g of recombinant protein per gram of fresh leaf tissue (Table 1). No evidence of degradation products was observed on the

immunoblots indicating that the expressed proteins are stable in the plant system. Thus, most of the plant-optimized genes are expressed properly in the *Nicotiana benthamiana* system.

Expression of the VP7 construct in our transient expression conditions resulted in severe toxicity and low protein yield. In contrast, plants infiltrated with the VP4 Δ and fljB constructs showed little bleaching and fewer necrotic lesions on leaves (Supplementary Figure 1). Expression of these constructs was moderate with yields of 5 μ g and 4.1 μ g of recombinant protein per gram of fresh leaf tissue respectively (Table 1). The recovered quantity of VP4 Δ was comparable to that reported for the VP8* subunit in *Nicotiana benthamiana* leaves (4 μ g per gram of fresh leaf tissue) (Perez Filgueira et al., 2004). Compared to VP4 Δ , the expression of VP7 was 5-fold lower (0.85 μ g per gram). Previous studies reported that stable expression of VP7 in transgenic potatoes yielded 40 μ g per gram of tuber in stable transgenic potatoes (Li et al., 2006). This is 47-fold higher than the level we obtained by transient expression in *Nicotiana benthamiana* leaves, even though the CaMV 35S promoter was used in both studies. This suggests that stable expression can yield higher levels than the transient expression approach. However, our system is rapid and efficient for most of the proteins tested (see below), compared to the time-consuming generation of transgenic plants.

The most conserved domain of eubacterial flagellin, flg22, induces defence responses in various dicotyledonous plants and appears to behave as an elicitor of the Serk3/BAK1 pathway (Heese et al., 2007). This pathway regulates the expression of various defence-related genes, which opened the way for the use of flagellins in strategies aiming to improve plant biotic stress. The development of transgenic plants that produce a flagellin has been reported only for rice (Takakura et al., 2008). This study reported that plants expressing the N1141 flagellin show enhanced disease

resistance to *Magnaporthe grisea*, the causal agent of rice blast. Work is in progress to generate stable *Arabidopsis thaliana* plants expressing fljB to assess its potential to induce the expression of defence-related genes and improve resistance to biotic stress.

The assembly of epitopes was previously shown to improve the immune response (Kovacs-Nolan and Mine, 2006). Therefore, the selected VP7, VP4 and fljB epitopes were assembled in various antigen-antigen combinations. Recent studies in mice have shown that a fusion between the rotavirus VP8* domain and the amino-terminal end of a truncated VP2 (first 92 amino acids) induces a higher titer of VP4-specific antibodies compared to VP8* alone (Istrate et al., 2008). Thus assembly of epitopes in a single fusion protein could improve the production of anti-HRV neutralizing antibodies. Unfortunately, expression of recombinant VP7::VP4 Δ and VP4 Δ ::VP7 proteins in *Nicotiana benthamiana* was very low under our experimental conditions (Table 1). The VP4 Δ ::VP7 antigen-antigen construct induced toxicity in infiltrated leaves and the chimeric protein was undetectable by immunoblot analysis (Figure 2C). This prompted us to test if the reciprocal construct VP7::VP4 Δ protein could be used. The data show that leaves of plants infiltrated with this construct display milder bleaching symptoms and accumulate a low level of protein (Figure 2C).

The expression of fljB flagellin and VP::fljB fusions has no effect on plant growth. Plants infiltrated with the VP7::fljB and VP4 Δ ::fljB constructs demonstrated minimal damage, and expressed the proteins to relatively high levels (32 μ g and 12 μ g of recombinant protein per gram of fresh leaf tissue, respectively) (Table 1). This high expression level could be due to the fusion of the VP antigens with the fljB fragment. Previous efforts to produce rotavirus antigens in plants have been reported (Wu et al., 2003; Choi et al., 2005; Dong et al., 2005; Saldana et al., 2006). However, none of these studies showed the expression of VP4 Δ or fljB or the fusion of rotavirus antigens with fljB. The results presented here show that the plant transient system is

efficient in expressing multiple combinations of pathogenic proteins which could be very helpful in studies aiming to determine the functions of viral proteins and in the development of diagnostic tests and vaccines (Lupiani et al., 1997).

4.2 Humoral responses in mice

To examine the protein-specific antibody response in mice, the systemic immunogenicity of the plant-derived antigens was investigated in BALB/c mice by subcutaneous injection of the extracts. For our study, we selected single antigen constructs VP7 and VP4 Δ because these proteins are known to induce the production of neutralizing antibodies. The presence of such HRV-specific antibodies is crucial to protect against infection (Franco et al., 2006). However, immunoblot analyses showed that immunization with VP7 or VP4 Δ did not elicit the production of HRV-specific antibodies in mice (Figure 3A). Results of indirect immunofluorescence and lymphoproliferation analyses (data not shown) were inconclusive, suggesting that the humoral and cellular responses in mice immunized with the HRV antigens are very weak and difficult to detect. This is probably due to the fact that the quantities of target recombinant proteins used for the primary immunization and/or the number of booster injections were insufficient. In contrast, the immunoblot and ELISA analyses (Figure 3A and 3B) confirmed that immunization with fljB, VP7::fljB or VP4 Δ ::fljB generated a strong and specific response against the fljB moiety. The accumulation of fljB-specific antibodies corroborates the high immunogenic potential of flagellins. *Salmonella*'s flagellin are well known PAMPs that activate innate immunity through the toll-like receptor TLR5 (Massis et al., 2008). Immunization with doses as low as 4.1 μ g of recombinant fljB protein induced the production of specific antibodies. The success of producing active fljB and the stimulation of the humoral response confirms the potential of using plants for the development of edible vaccines against *Salmonella typhimurium*.

Interestingly, Kumar et al. (Vijay-Kumar et al., 2008) recently showed that systemic administration of *Salmonella typhimurium* flagellin protected mice against chemical, bacterial, viral and radiation challenge without any adverse effect. These observations, along with the fact that flagellin induces expression of various genes with anti-apoptotic, antibacterial and other cytoprotectant activities (Vijay-Kumar et al., 2008), suggest that a flagellin treatment could protect human populations against select dangers. The production of edible and relatively safe immune activators such as flagellin will certainly be advantageous for these applications.

5 ACKNOWLEDGMENTS

We thank Prof. France Daigle (Université de Montréal, Canada) for providing genomic DNA of the *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium* SL1344 strain. We also thank Dr. Yoo (University of Guelph, Canada) for providing the MA104 cells and human rotavirus G1P1A[8] serogroup Wa strain, and Marie-Claude Saint-Louis (UQAM) and Zahra Agharbaoui (UQAM) for helpful discussions and technical assistance. This work is supported by grants from the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC) and the Canadian Institutes of Health Research (CIHR) to DA and FS.

6 TABLE(S)

Table 1 : Molecular weight and yield of recombinant proteins in plant extracts

| Extracts | Transcript | Protein | MW (kDa) | Yield ($\mu\text{g/g}$) |
|-------------------------------------|------------|---------|-------------|------------------------------|
| <i>single constructs</i> | | | | |
| VP7 | + | + | 38.4 | 0.85 |
| VP4Δ | + | + | 38.5 | 5.0 |
| fljB | + | + | 53.2 | 4.1 |
| <i>dimeric constructs</i> | | | | |
| VP7::VP4Δ | + | + | 76.8 | ND |
| VP4Δ::VP7 | + | - | 76.8 | ND |
| VP7::fljB | + | + | 90.9 | 31.97 |
| VP4Δ::fljB | + | + | 91.2 | 12.3 |

Production of recombinant proteins in *Nicotiana benthamiana* following *Agrobacterium*-mediated transient expression. Transcript and protein accumulation were determined by RT-PCR and immunoblot analysis, respectively. (+) and (-) indicate presence or absence of signal. The proteins detected on SDS-PAGE gels (not shown) migrated to the predicted molecular weight of the various proteins. The yield of target protein in leaf extracts was determined by blot densitometry using calibrated protein standards, and is expressed as μg of recombinant protein per gram of fresh weight of agro-infiltrated leaves. ND, not determined.

7 CAPTIONS TO ILLUSTRATIONS

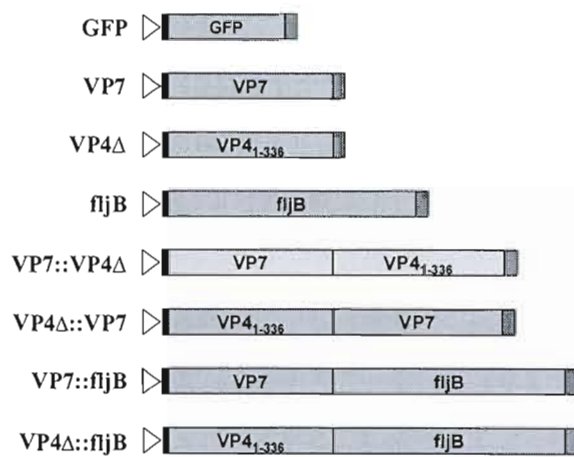
Figure 1. Constructs used for expression of HRV and *Salmonella* proteins in *Nicotiana benthamiana* leaves. The sequence encoding the SEKDEL retention signal was inserted at the 3' end of the coding sequence. White arrowheads, Cauliflower Mosaic Virus (CaMV) double 35S promoter. Black boxes, Tobacco Etch Virus 5' untranslated region. Grey boxes, coding regions. Dark grey boxes, CaMV 35S terminator.

Figure 2. Expression in *Escherichia coli* and *Nicotiana benthamiana*. (A) Recombinant His-tagged proteins expressed in *Escherichia coli* were analyzed by immunoblotting using an HRP-coupled anti-His antibody and signals were detected by chemiluminescence. BSA, bovine serum albumine (BSA) used as a negative control. (B) Target transcripts expressed in agro-infiltrated *Nicotiana benthamiana* leaves were reverse-transcribed using SuperScript II reverse transcriptase, then amplified by PCR. Lower panel, Actin 2 used as a loading control. No signal was detected in leaves agro-infiltrated with the negative control constructs GFP and empty vector (data not shown). (C) Target proteins were detected by immunoblot analysis using anti-His::VP7 Δ , anti-His::VP4 Δ or anti-His::fljB antibodies. Exposure times varied between each construct and antibody.

Figure 3. Detection of antigen-specific antibodies in mice antisera. (A) His-tagged recombinant VP7 Δ , VP4 Δ and fljB proteins (0.25 to 2 μ g; indicated at the top) were analyzed by immunoblotting with antisera obtained from mice immunized with the various plant-expressed proteins as indicated on the panels. (B) Serum (1:10,000 dilution) fljB-specific IgGs were measured by indirect ELISA. The values are presented as mean \pm SD. Mouse pre-immune serum and rabbit anti-His::fljB antibody were used as negative and positive controls respectively.

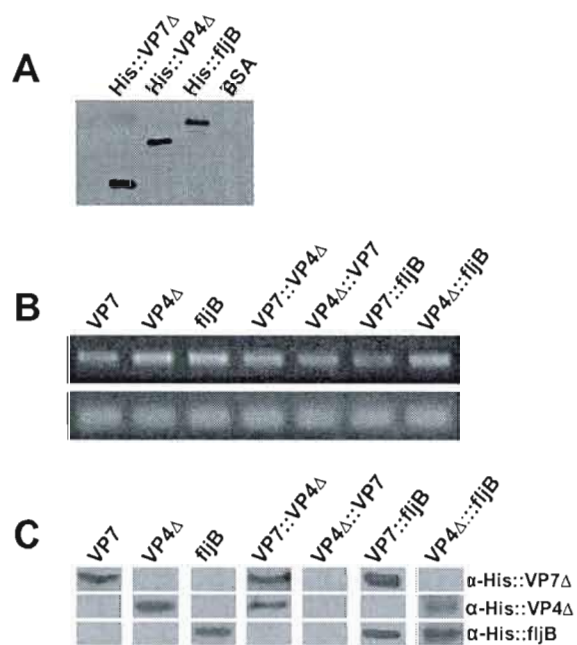
8 ILLUSTRATIONS

Figure 1 : Constructs used for expression in tobacco leaves



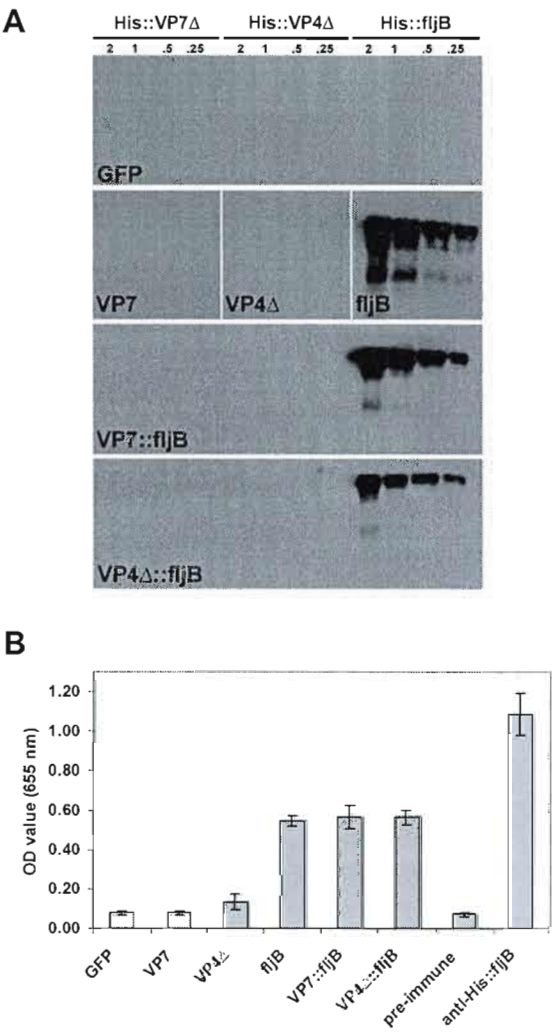
ILLUSTRATIONS

Figure 2 : Expression of recombinant His-tagged proteins in *E. coli* and various constructs in *Nicotiana benthamiana* leaves



ILLUSTRATIONS

Figure 3 : Immunoblot and ELISA detection of His-Tagged recombinant proteins with mice sera



9 SUPPLEMENTARY DATA

Supplementary Table 1 : Primers used for the generation of constructs and for RT-PCR analyses

Primers used for the generation of constructs in pTrcHisB. The restriction enzyme cutting sites used for cloning are underlined.

| | |
|------------|--|
| VP7_WT(F) | CGCAGATCTATGTATCCAAGCAAG |
| VP7_WT(R) | GCGCAAGCTTTCACTACTCGAGTACTCTATAATAAAAGCTG |
| VP4_WT(F) | GCGGAGATCTGCCACCATGGCTTCACTCATTTATAG |
| VP4_WT(R) | GGTATTAGATCTTCATCACCTCCATTATAGCTAAAATTGTTCACTCCA |
| FljB_WT(F) | GAGAGGTACCATGGCACAAGTAATCAACACTAAC |
| FljB_WT(R) | GAGAGAATTCCTAACGTAACAGAGACAGCACGTT |

Primers used for the generation of single and dimeric constructs in pRTL2. Blunt PCR fragments were cloned into pBlueScript(SK) before cloning in the pRTL2 vector. The restriction enzyme cutting sites used for cloning are underlined.

Single constructs

| | |
|---------|--|
| GFP(F) | GAGACCATGGGTAAAGGAGAACT |
| GFP(R) | GAGATCTAGAGGGGAGCTCCTAGATAGATCTGTATAGTTCAT |
| VP7(F) | GAGACCATGGGTACGGTATTGAGTACACCACC |
| VP7(R) | GAGATCTAGAGGGGAGCTCCTAAAGCTCATCCTTTTCACTAACACGGTAG |
| VP4(F) | GAGACCATGGCTTCTCTTATCTACCGTCAG |
| VP4(R) | GAGATCTAGAGGGGAGCTCCTAAAGCTCATCCTTTTCACTACCACCGTTG |
| FljB(F) | GAGATCTAGAATGGCACAAGTAATCAACACTAAC |
| FljB(R) | GAGAGAATTCGGGAGCTCCTAAAGCTCATCCTTTTCACTACGTAACAGAGACAGCACGTT |

Dimeric constructs

| | |
|-----------|--|
| VP7_1(F) | GAGATCTAGAATGTACGGTATTGAGTACACCACC |
| VP7_1(R) | GAGAGAATTCGGGAGATCTAACACGGTAGTAGAAAGCAGC |
| VP7_2(F) | GAGAAGATCTGCCACCATGTACGGTATTGAGTACACCACC |
| VP7_2(R) | GAGAGAATTCGGGAGCTCCTAAAGCTCATCCTTTTCACTAACACGGTAGTAGAAAGCAGC |
| VP4_1(F) | GAGATCTAGAATGGCTTCTCTTATCTACCGTCAG |
| VP4_1(R) | GAGAGAATTCGGGGGATCCACCACCGTTGTAAGAGAA |
| VP4_2(F) | GAGAGGATCCGGGGCCACCATGGCTTCTCTTATCTACCGTCAG |
| VP4_2(R) | GAGAGAATTCGGGAGCTCCTAAAGCTCATCCTTTTCACTACCACCGTTGTAAGAGAA |
| FljB_2(F) | GAGAGGATCCGCCACCATGGCACAAGTAATCAACACTAAC |
| FljB_2(R) | GAGAGAATTCGGGAGCTCCTAAAGCTCATCCTTTTCACTACGTAACAGAGACAGCACGTT |

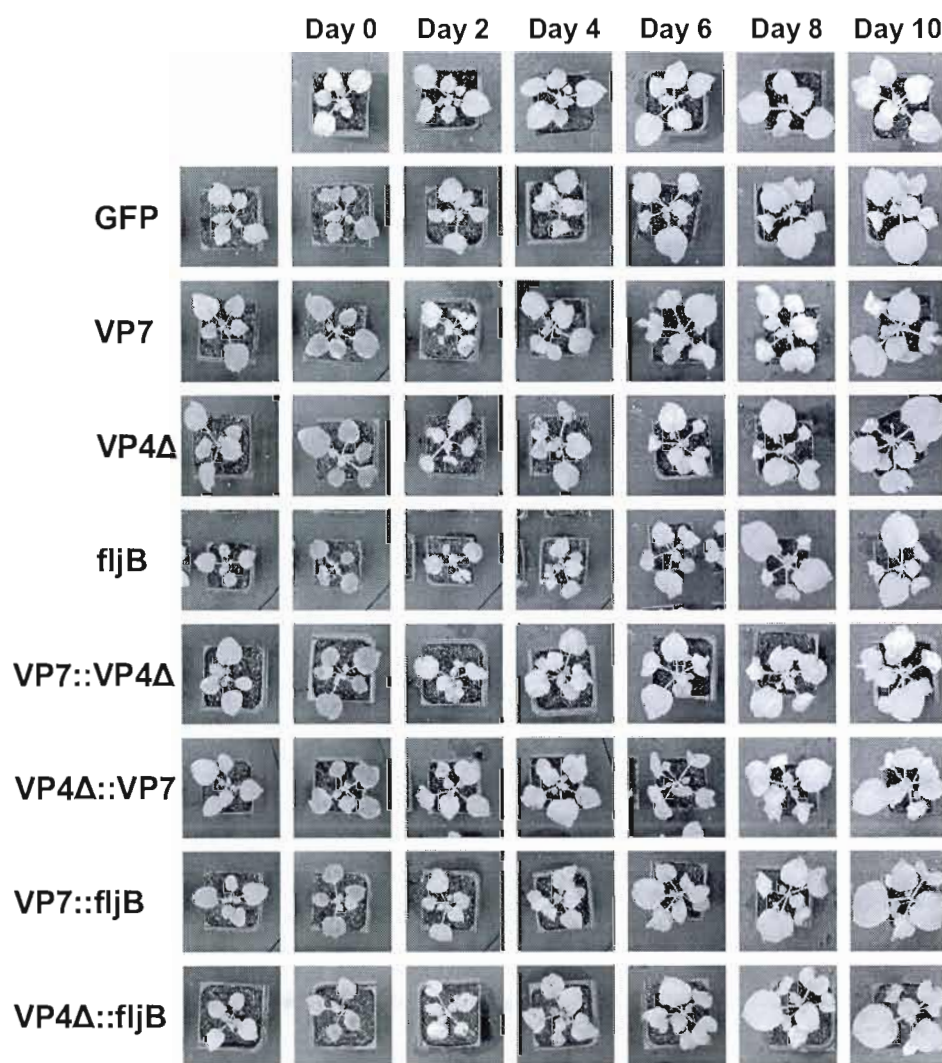
Primers used for RT-PCR analyses.

| | |
|----------------|-------------------------------|
| RT-VP7(F) | GTGGTGGCAAGTTTCTACACCATCG |
| RT-VP8(F) | GGCTGCTAACTACCAGTACAACCTTAGGG |
| RT-Fljb(F) | CCGAAGTTTCCAACATGTCTCGCG |
| RT-CaMVterm(R) | GCATGCCTGCAGGTCACCTGGATT |
| RT-Actin2(F) | TCAGATGCCCAGAAGTGTGTT |
| RT-Actin2(R) | CCGTACAGATCCTTCCTGATAT |

SUPPLEMENTARY DATA

Supplementary Figure 1 : *Nicotiana benthamiana* plants following agro-infiltration

Nicotiana benthamiana plants following agro-infiltration. Three week-old plants were agro-infiltrated at day 0 with *Agrobacterium tumefaciens* strain AGL1 carrying the various constructs in the pCambia1380 vector. Mock-infiltrated plants are shown on the first row.



10 ANNEX

Additional commentary: Our results show that under our experimental conditions, the plant-expressed HRV antigens could not raise specific antibodies in mice. This is probably due to the fact that the quantities of target recombinant proteins used for the primary immunization and/or the number of booster injections were insufficient. Another possibility is that the immunogenicity of the recombinant proteins, which are retained in the ER, could have been compromised. Previous studies reported that a VP7 protein that has not undergone proper post-translational modifications did not induce neutralizing antibodies, possibly because its conformation was different from the mature VP7 protein found in the assembled virus (Choi *et al.*, 2006b). In contrast, other work showed that the ER-tagged VP7 seemed to maintain its neutralizing immunity in stable potato transformants (Wu *et al.*, 2003). Thus, the retention of recombinant proteins in the ER through the SEKDEL peptide could influence the immunogenicity of HRV antigens expressed in the plant transient expression system. Another element that has to be investigated further is the nature of post-translational modifications. The glycosylation pattern of VP7 has been linked to blocking or alteration of recognition by antibodies (Martella *et al.*, 2005). It is known that the protein glycosylation patterns in plant cells are different from those in animal cells. Generation of plant mutants which allow a controlled human-type glycosylation of recombinant proteins (Strasser *et al.*, 2009) could improve the immunogenicity of the plant-expressed VP7.

Our results also showed that antigen-adjuvant combinations could not raise antibodies specific to VP7 or VP4. One explanation could be that the GSAT flexible hinge peptide between the protein moieties did not reduce steric hindrance, thus inducing a weaker presentation of epitopes by the VP7 or VP4 antigens. Studies on VP4 showed that orientation and copy number of the epitopes can influence the way in which they

are processed and presented, thereby affecting the specificity, levels and affinities of the antibodies produced following immunization (Kovacs-Nolan and Mine, 2006). Another explanation, which is more likely, is that the immunodominance of fljB epitopes could decrease recognition of the HRV epitopes.

As mentioned above, immunization with fljB, VP7::fljB, VP4::fljB or VP4::VP7::fljB generated a strong and specific response against the fljB moiety, confirming the high immunogenic potential of the *Salmonella* protein. The plant-expressed fljB fusions successfully raised specific mouse anti-fljB antibodies. Immunization with doses as low as 0.4 µg of recombinant VP4::VP7::fljB protein induced the production of specific antibodies. These results indicate the high potential of fljB as an immunogen.

Salmonella typhimurium, a causal agent of gastroenteritis in humans, is the second most frequent strain found in humans since 1990 (Galanis *et al.*, 2006). This serovar is a host-generalist able to infect a wide range of animals. The *Salmonella typhimurium* vaccine currently available, Poulvac ST (Fort Dodge Animal Health Inc, Overland Park, KS)[®], is used to reduce *Salmonella enteritidis* infection in chickens. To generate this live bacterial culture vaccine, the *aro-A* gene was deleted to render the bacterium unable to synthesize chorismate. This modification prevents it from spreading in the host or in the environment. However, consumption of food products derived from vaccinated poultry could still raise health concerns. The use of a vaccine generated from live pathogens presents some risks like reversion to virulence or hypersensitive immune responses to vaccine components. A plant-based *Salmonella typhimurium* subunit vaccine would thus represent a safe and cost-effective alternative.

CONCLUSION & PROSPECTIVE

Plusieurs études antérieures ont démontré que les plantes constituent un système d'expression prometteur pour la production d'antigènes provenant de divers pathogènes comme le rotavirus humain (RVH). Dans cette étude, nous avons démontré que le système d'expression transitoire d'agroinfiltration de *Nicotiana benthamiana* permet de produire des antigènes multiples de RVH et de *Salmonella thyphimurium*. Les antigènes VP7, VP4 Δ et fljB ont été produits avec succès dans les feuilles agroinfiltrées. Différentes constructions simple, double et triple ont été exprimées avec un rendement entre 0.85 et 31.97 μ g de protéine recombinante par gramme de feuilles fraîches. Toutes les constructions contenant le fragment fljB ont permis d'induire la production d'anticorps spécifiques à fljB dans les souris immunisées avec les extraits végétaux. Malheureusement, dans nos conditions expérimentales, aucun anticorps spécifique à VP7 ou VP4 n'a été détecté.

Ces résultats contredisent la littérature qui rapporte certaines études où les antigènes de RVH sont produits dans des plantes et induisent une réponse immunitaire détectable chez la souris. Divers facteurs peuvent être à la base de l'absence de ces anticorps. Une première explication pour l'absence d'anticorps spécifique à VP7 et VP4 repose sur la quantité de protéines recombinantes et/ou le nombre d'injections administrées lors de l'immunisation des souris avec les extraits végétaux. Une quantité d'antigène trop faible pourrait expliquer la faible réponse humorale et cellulaire observée. Une seconde explication, touche le niveau immunogène des protéines recombinantes dans les extraits végétaux. En effet, plusieurs facteurs peuvent compromettre le caractère immunogène des protéines VP. Des publications antérieures ont démontré que les modifications post-traductionnelles sont importantes pour l'induction d'anticorps neutralisants chez la protéine VP7 (Martella et al., 2005; Choi et al., 2006b). Ces modifications permettent une conformation adéquate de la

protéine mature et le caractère immunogène dépend donc de la structure protéique finale. La rétention des protéines recombinantes dans le réticulum endoplasmique (induit par le signal SEKDEL), le niveau de glycosylation et le repliement imprévisible des protéines chimériques peuvent tous influencer le niveau immunogène des protéines recombinantes dans les extraits végétaux. L'absence d'anticorps spécifiques à VP7 ou VP4 a également été observée avec l'emploi des constructions doubles antigène-antigène et antigène-adjuvant. Dans ce cas, l'orientation et le nombre d'épitopes dans la protéine chimérique influencent probablement les niveaux d'affinité et de spécificité des anticorps suite aux immunisations (Kovacs-Nolan and Mine, 2006). L'immunodominance des épitopes de fljB a également le potentiel de réduire considérablement la réponse face aux épitopes de VP7 ou VP4 dans les constructions antigène-adjuvant double ou triple.

Plusieurs avenues sont envisageables pour optimiser le caractère immunogène des protéines recombinantes VP chez les plantes. Par exemple, on peut envisager de modifier les processus de glycosylation et permettre une conformation ainsi qu'une présentation convenable des épitopes clés. Les niveaux d'expression d'accumulation et de purification des protéines recombinantes doivent être supérieurs. Un meilleur rendement pourrait être atteint avec la transformation stable des plantes et l'établissement de lignées transgéniques. Finalement, la transformation stable de plantes comestibles, tel le soya ou la luzerne, pourrait permettre une production à grande échelle des protéines recombinantes et constituer un réservoir fiable pour la production d'un vaccin sous-unitaire. De plus la production de plantes transgéniques comestible permettrait d'évaluer la réponse immunitaire mucosale avec l'inoculation des protéines recombinantes par voie orale (Floss et al., 2007) et de comparer celle-ci avec la voie sous-cutanée. Ces travaux sont actuellement en cours en parallèle avec l'approche combinatoire adénovirus-plantes (travaux d'Aurélien Girard au laboratoire de Denis Archambault).

Heureusement, le succès des immunisations avec le fragment fljB permet d'envisager plusieurs applications basées sur les résultats obtenus lors de ce travail. Au niveau du développement de vaccins à base de plantes, l'induction d'anticorps IgG spécifiques à fljB confirme que l'emploi de protéines recombinantes produites dans les plantes a le potentiel de stimuler le système immunitaire de façon adéquate. Des vaccins contre le pathogène *Salmonella typhimurium*, comme Poulvac ST®, sont disponibles actuellement sur le marché pour immuniser les volailles. Ce vaccin est basé sur une culture bactérienne vivante atténuée. Une délétion du gène aro-A rend cette souche incapable de synthétiser le chorismate et donc de se répandre chez son hôte ou dans l'environnement. Cependant, certains risques sont inhérents à la nature du vaccin comme une probabilité de réversion à la virulence ou une hypersensibilité allergique aux composants du vaccins. Un vaccin sous-unitaire à base de plante contre les infections à *Salmonella typhimurium* représenterait donc une alternative sécuritaire et économique.

Les travaux en cours au laboratoire sur la production de fljB ciblent la transformation stable de plantes et portent également sur la caractérisation de l'impact de l'expression de la flagelline sur le système de défense végétal. En effet, les protéines qui composent les flagelles des bactéries sont reconnus comme un patron moléculaire associé aux pathogènes par le système de défense des plantes. Les flagellines complètes induisent habituellement une réponse hypersensible qui mène à une mort localisée des cellules végétales. Le motif conservé flg22 induit la réponse de défense chez la majorité des dicotylédones et semble induire la voie Serk3/BAK1 qui régulent plusieurs gènes de défense (Heese et al., 2007). L'absence de nécrose sur nos feuilles de tabac agro-infiltrées avec les constructions fljB et VP::fljB suggère une tolérance envers la flagelline fljB et une absence de la réponse de défense.

Comme projet futur sur les plantes transgéniques exprimant fljB, une étude de l'expression des gènes de défense et de la résistance aux stress biotiques serait des plus pertinentes. Récemment, la caractérisation de la première plante de riz transgénique exprimant une flagelline N1141 a été publiée. Cette étude démontre une résistance accrue des plantes transgéniques à *Magnaporthe grisea*, l'agent responsable de la pyriculariose du riz et d'autres *Poaceae* (Takakura et al., 2008). Ces résultats confirment la modulation du système de défense par les flagellines dans les cellules végétales. Afin de mieux comprendre ces mécanismes de résistance aux pathogènes, des études plus avancées sur les plantes exprimant des flagellines recombinantes apparaissent pertinente.

RÉFÉRENCES

- Archambault, D., Morin, G., Elazhary, Y., Joncas, J.H., and Roy, R.S.** (1988). Standardization and kinetics of *in vitro* bovine blood lymphocyte stimulation with bovine rotavirus. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis* **11**, 11-20.
- Azevedo, M.S., Yuan, L., Pouly, S., Gonzales, A.M., Jeong, K.I., Nguyen, T.V., and Saif, L.J.** (2006). Cytokine responses in gnotobiotic pigs after infection with virulent or attenuated human rotavirus. *J Virol* **80**, 372-382.
- Barman, P., Ghosh, S., Samajdar, S., Mitra, U., Dutta, P., Bhattacharya, S.K., Krishnan, T., Kobayashi, N., and Naik, T.N.** (2006). RT-PCR based diagnosis revealed importance of human group B rotavirus infection in childhood diarrhea. *J Clin Virol* **36**, 222-227.
- Benureau, Y., Huet, J.C., Charpilienne, A., Poncet, D., and Cohen, J.** (2005). Trypsin is associated with the rotavirus capsid and is activated by solubilization of outer capsid proteins. *J Gen Virol* **86**, 3143-3151.
- Blutt, S.E., Crawford, S.E., Warfield, K.L., Lewis, D.E., Estes, M.K., and Conner, M.E.** (2004). The VP7 outer capsid protein of rotavirus induces polyclonal B-cell activation. *J Virol* **78**, 6974-6981.
- Blutt, S.E., Kirkwood, C.D., Parreno, V., Warfield, K.L., Ciarlet, M., Estes, M.K., Bok, K., Bishop, R.F., and Conner, M.E.** (2003). Rotavirus antigenaemia and viraemia: a common event? *Lancet* **362**, 1445-1449.
- Buzby, J.C., and Roberts, T.** (2009). The economics of enteric infections: human foodborne disease costs. *Gastroenterology* **136**, 1851-1862.
- Casola, A., Garofalo, R.P., Crawford, S.E., Estes, M.K., Mercurio, F., Crowe, S.E., and Brasier, A.R.** (2002). Interleukin-8 gene regulation in intestinal epithelial cells infected with rotavirus: role of viral-induced IkappaB kinase activation. *Virology* **298**, 8-19.
- Chaibi, C., Cotte-Laffitte, J., Sandre, C., Esclatine, A., Servin, A.L., Quero, A.M., and Geniteau-Legendre, M.** (2005). Rotavirus induces apoptosis in fully differentiated human intestinal Caco-2 cells. *Virology* **332**, 480-490.
- Chang, K.O., Vandal, O.H., Yuan, L., Hodgins, D.C., and Saif, L.J.** (2001). Antibody-secreting cell responses to rotavirus proteins in gnotobiotic pigs inoculated with attenuated or virulent human rotavirus. *J Clin Microbiol* **39**, 2807-2813.
- Choi, N.W., Estes, M.K., and Langridge, W.H.** (2005). Synthesis and assembly of a cholera toxin B subunit-rotavirus VP7 fusion protein in transgenic potato. *Mol Biotechnol* **31**, 193-202.
- Choi, N.W., Estes, M.K., and Langridge, W.H.** (2006a). Mucosal immunization with a ricin toxin B subunit-rotavirus NSP4 fusion protein stimulates a Th1 lymphocyte response. *J Biotechnol* **121**, 272-283.

- Choi, N.W., Estes, M.K., and Langridge, W.H.** (2006b). Synthesis of a ricin toxin B subunit-rotavirus VP7 fusion protein in potato. *Mol Biotechnol* **32**, 117-128.
- Choi, N.W., Estes, M.K., and Langridge, W.H.** (2006c). Ricin toxin B subunit enhancement of rotavirus NSP4 immunogenicity in mice. *Viral Immunol* **19**, 54-63.
- Ciarlet, M., and Estes, M.K.** (2001). Interactions between rotavirus and gastrointestinal cells. *Curr Opin Microbiol* **4**, 435-441.
- Cuadros, C., Lopez-Hernandez, F.J., Dominguez, A.L., McClelland, M., and Lustgarten, J.** (2004). Flagellin fusion proteins as adjuvants or vaccines induce specific immune responses. *Infect Immun* **72**, 2810-2816.
- Cunliffe, N., and Nakagomi, O.** (2007). Introduction of rotavirus vaccines in developing countries: remaining challenges. *Ann Trop Paediatr* **27**, 157-167.
- Cunliffe, N.A., and Nakagomi, O.** (2005). A critical time for rotavirus vaccines: a review. *Expert Rev Vaccines* **4**, 521-532.
- Dong, J.L., Liang, B.G., Jin, Y.S., Zhang, W.J., and Wang, T.** (2005). Oral immunization with pBsVP6-transgenic alfalfa protects mice against rotavirus infection. *Virology* **339**, 153-163.
- Dormitzer, P.R., Nason, E.B., Prasad, B.V., and Harrison, S.C.** (2004). Structural rearrangements in the membrane penetration protein of a non-enveloped virus. *Nature* **430**, 1053-1058.
- Dus Santos, M.J., and Wigdorovitz, A.** (2005). Transgenic plants for the production of veterinary vaccines. *Immunol Cell Biol* **83**, 229-238.
- Floss, D.M., Falkenburg, D., and Conrad, U.** (2007). Production of vaccines and therapeutic antibodies for veterinary applications in transgenic plants: an overview. *Transgenic Res* **16**, 315-332.
- Franco, M.A., Angel, J., and Greenberg, H.B.** (2006). Immunity and correlates of protection for rotavirus vaccines. *Vaccine* **24**, 2718-2731.
- Galanis, E., Lo Fo Wong, D.M., Patrick, M.E., Binsztein, N., Cieslik, A., Chalermchikit, T., Aidara-Kane, A., Ellis, A., Angulo, F.J., and Wegener, H.C.** (2006). Web-based surveillance and global *Salmonella* distribution, 2000-2002. *Emerg Infect Dis* **12**, 381-388.
- Girard, M.P., Steele, D., Chaignat, C.L., and Kieny, M.P.** (2006). A review of vaccine research and development: human enteric infections. *Vaccine* **24**, 2732-2750.
- Giritch, A., Marillonnet, S., Engler, C., van Eldik, G., Botterman, J., Klimyuk, V., and Gleba, Y.** (2006). Rapid high-yield expression of full-size IgG antibodies in plants coinfecting with noncompeting viral vectors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**, 14701-14706.
- Glass, R.I., and Parashar, U.D.** (2006). The promise of new rotavirus vaccines. *N Engl J Med* **354**, 75-77.

- Graham, K.L., Takada, Y., and Coulson, B.S.** (2006). Rotavirus spike protein VP5* binds alpha2beta1 integrin on the cell surface and competes with virus for cell binding and infectivity. *J Gen Virol* **87**, 1275-1283.
- Guerrant, R.L., Kosek, M., Moore, S., Lorntz, B., Brantley, R., and Lima, A.A.** (2002). Magnitude and impact of diarrheal diseases. *Arch Med Res* **33**, 351-355.
- Guerrero, C.A., Mendez, E., Zarate, S., Isa, P., Lopez, S., and Arias, C.F.** (2000). Integrin alpha(v)beta(3) mediates rotavirus cell entry. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 14644-14649.
- Heese, A., Hann, D.R., Gimenez-Ibanez, S., Jones, A.M., He, K., Li, J., Schroeder, J.I., Peck, S.C., and Rathjen, J.P.** (2007). The receptor-like kinase SERK3/BAK1 is a central regulator of innate immunity in plants. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**, 12217-12222.
- Hoshino, Y., and Kapikian, A.Z.** (1996). Classification of rotavirus VP4 and VP7 serotypes. *Arch Virol Suppl* **12**, 99-111.
- Huleatt, J.W., Jacobs, A.R., Tang, J., Desai, P., Kopp, E.B., Huang, Y., Song, L., Nakaar, V., and Powell, T.J.** (2007). Vaccination with recombinant fusion proteins incorporating Toll-like receptor ligands induces rapid cellular and humoral immunity. *Vaccine* **25**, 763-775.
- Istrate, C., Hinkula, J., Charpilienne, A., Poncet, D., Cohen, J., Svensson, L., and Johansen, K.** (2008). Parenteral administration of RF 8-2/6/7 rotavirus-like particles in a one-dose regimen induce protective immunity in mice. *Vaccine* **26**, 4594-4601.
- Jaimes, M.C., Feng, N., and Greenberg, H.B.** (2005). Characterization of homologous and heterologous rotavirus-specific T-cell responses in infant and adult mice. *J Virol* **79**, 4568-4579.
- Kane, N.A., Agharbaoui, Z., Diallo, A.O., Adam, H., Tominaga, Y., Ouellet, F., and Sarhan, F.** (2007). TaVRT2 represses transcription of the wheat vernalization gene TaVRN1. *Plant J* **51**, 670-680.
- Kang, G., Raman, T., Green, J., Gallimore, C.I., and Brown, D.W.** (2001). Distribution of rotavirus G and P types in north and south Indian children with acute diarrhea in 1998-99. *Trans R Soc Trop Med Hyg* **95**, 491-492.
- Kovacs-Nolan, J., and Mine, Y.** (2006). Tandem copies of a human rotavirus VP8 epitope can induce specific neutralizing antibodies in BALB/c mice. *Biochim Biophys Acta* **1760**, 1884-1893.
- Leung, A.K., Kellner, J.D., and Davies, H.D.** (2005). Rotavirus gastroenteritis. *Adv Ther* **22**, 476-487.
- Li, J.T., Fei, L., Mou, Z.R., Wei, J., Tang, Y., He, H.Y., Wang, L., and Wu, Y.Z.** (2006). Immunogenicity of a plant-derived edible rotavirus subunit vaccine transformed over fifty generations. *Virology* **356**, 171-178.

- Lupiani, B., Reddy, S.M., Subramanian, K., and Samal, S.K.** (1997). Cloning, sequence analysis and expression of the major outer capsid protein gene of an aquareovirus. *J Gen Virol* **78** (Pt 6), 1379-1383.
- Martella, V., Ciarlet, M., Baselga, R., Arista, S., Elia, G., Lorusso, E., Banyai, K., Terio, V., Madio, A., Ruggeri, F.M., Falcone, E., Camero, M., Decaro, N., and Buonavoglia, C.** (2005). Sequence analysis of the VP7 and VP4 genes identifies a novel VP7 gene allele of porcine rotaviruses, sharing a common evolutionary origin with human G2 rotaviruses. *Virology* **337**, 111-123.
- Massis, L.M., Braga, C.J., Sbrogio-Almeida, M.E., Lauand, C., Newton, S.M., Klebba, P.E., and Ferreira, L.C.** (2008). Anti-flagellin antibody responses elicited in mice orally immunized with attenuated *Salmonella enterica* serovar Typhimurium vaccine strains. *Mem Inst Oswaldo Cruz* **103**, 606-610.
- McQuiston, J.R., Parrenas, R., Ortiz-Rivera, M., Gheesling, L., Brenner, F., and Fields, P.I.** (2004). Sequencing and comparative analysis of flagellin genes *fliC*, *fliB*, and *flpA* from *Salmonella*. *J Clin Microbiol* **42**, 1923-1932.
- Means, T.K., Hayashi, F., Smith, K.D., Aderem, A., and Luster, A.D.** (2003). The Toll-like receptor 5 stimulus bacterial flagellin induces maturation and chemokine production in human dendritic cells. *J Immunol* **170**, 5165-5175.
- Mechin, V., Damerval, C., and Zivy, M.** (2007). Total protein extraction with TCA-acetone. *Methods Mol Biol* **355**, 1-8.
- Monnier, N., Higo-Moriguchi, K., Sun, Z.Y., Prasad, B.V., Taniguchi, K., and Dormitzer, P.R.** (2006). High-resolution molecular and antigen structure of the VP8* core of a sialic acid-independent human rotavirus strain. *J Virol* **80**, 1513-1523.
- Murthy, K.G., Deb, A., Goonesekera, S., Szabo, C., and Salzman, A.L.** (2004). Identification of conserved domains in *Salmonella muenchen* flagellin that are essential for its ability to activate TLR5 and to induce an inflammatory response *in vitro*. *J Biol Chem* **279**, 5667-5675.
- Narvaez, C.F., Angel, J., and Franco, M.A.** (2005). Interaction of rotavirus with human myeloid dendritic cells. *J Virol* **79**, 14526-14535.
- Neutra, M.R., and Kozlowski, P.A.** (2006). Mucosal vaccines: the promise and the challenge. *Nat Rev Immunol* **6**, 148-158.
- Otten, M.A., and van Eegmond, M.** (2004). The Fc receptor for IgA (FcalphaRI, CD89). *Immunol Lett* **92**, 23-31.
- Padilla-Noriega, L., Mendez-Toss, M., Menchaca, G., Contreras, J.F., Romero-Guido, P., Puerto, F.I., Guiscafne, H., Mota, F., Herrera, I., Cedillo, R., Munoz, O., Calva, J., Guerrero, M.L., Coulson, B.S., Greenberg, H.B., Lopez, S., and Arias, C.F.** (1998). Antigenic and genomic diversity of human rotavirus VP4 in two consecutive epidemic seasons in Mexico. *J Clin Microbiol* **36**, 1688-1692.

- Pappas, K.M.** (2008). Cell-cell signaling and the *Agrobacterium tumefaciens* Ti plasmid copy number fluctuations. *Plasmid* **60**, 89-107.
- Parashar, U.D., and Glass, R.I.** (2006). Public health. Progress toward rotavirus vaccines. *Science* **312**, 851-852.
- Parashar, U.D., Gibson, C.J., Bresse, J.S., and Glass, R.I.** (2006). Rotavirus and severe childhood diarrhea. *Emerg Infect Dis* **12**, 304-306.
- Perez Filgueira, D.M., Mozgovoij, M., Wigdorovitz, A., Dus Santos, M.J., Parreno, V., Trono, K., Fernandez, F.M., Carrillo, C., Babiuk, L.A., Morris, T.J., and Borca, M.V.** (2004). Passive protection to bovine rotavirus (BRV) infection induced by a BRV VP8* produced in plants using a TMV-based vector. *Arch Virol* **149**, 2337-2348.
- Pesavento, J.B., Crawford, S.E., Estes, M.K., and Prasad, B.V.** (2006). Rotavirus proteins: structure and assembly. *Curr Top Microbiol Immunol* **309**, 189-219.
- Pesavento, J.B., Crawford, S.E., Roberts, E., Estes, M.K., and Prasad, B.V.** (2005). pH-induced conformational change of the rotavirus VP4 spike: implications for cell entry and antibody neutralization. *J Virol* **79**, 8572-8580.
- Pino, O., Martin, M., and Michalek, S.M.** (2005). Cellular mechanisms of the adjuvant activity of the flagellin component FljB of *Salmonella enterica* Serovar *Typhimurium* to potentiate mucosal and systemic responses. *Infect Immun* **73**, 6763-6770.
- Prasad, B.V., Crawford, S., Lawton, J.A., Pesavento, J., Hardy, M., and Estes, M.K.** (2001). Structural studies on gastroenteritis viruses. *Novartis Found Symp* **238**, 26-37; discussion 37-46.
- Restrepo, M.A., Freed, D.D., and Carrington, J.C.** (1990). Nuclear transport of plant potyviral proteins. *Plant Cell* **2**, 987-998.
- Ruiz-Palacios, G.M., Perez-Schael, I., Velazquez, F.R., Abate, H., Breuer, T., Clemens, S.C., Cheuvart, B., Espinoza, F., Gillard, P., Innis, B.L., Cervantes, Y., Linhares, A.C., Lopez, P., Macias-Parra, M., Ortega-Barria, E., Richardson, V., Rivera-Medina, D.M., Rivera, L., Salinas, B., Pavia-Ruz, N., Salmeron, J., Ruttimann, R., Tinoco, J.C., Rubio, P., Nunez, E., Guerrero, M.L., Yarzabal, J.P., Damaso, S., Tornieporth, N., Saez-Llorens, X., Vergara, R.F., Vesikari, T., Bouckennooghe, A., Clemens, R., De Vos, B., and O'Ryan, M.** (2006). Safety and efficacy of an attenuated vaccine against severe rotavirus gastroenteritis. *N Engl J Med* **354**, 11-22.
- Ryan, E.J., Daly, L.M., and Mills, K.H.** (2001). Immunomodulators and delivery systems for vaccination by mucosal routes. *Trends Biotechnol* **19**, 293-304.
- Saldana, S., Esquivel Guadarrama, F., Olivera Flores Tde, J., Arias, N., Lopez, S., Arias, C., Ruiz-Medrano, R., Mason, H., Mor, T., Richter, L., Arntzen, C.J., and Gomez Lim, M.A.** (2006). Production of rotavirus-like particles in tomato (*Lycopersicon esculentum* L.) fruit by expression of capsid proteins VP2 and VP6 and immunological studies. *Viral Immunol* **19**, 42-53.

- Santos, N., and Hoshino, Y.** (2005). Global distribution of rotavirus serotypes/genotypes and its implication for the development and implementation of an effective rotavirus vaccine. *Rev Med Virol* **15**, 29-56.
- Shaw, A.R.** (2006). The rotavirus vaccine saga. *Annu Rev Med* **57**, 167-180.
- Simon, R., and Samuel, C.E.** (2007). Activation of NF-kappaB-dependent gene expression by Salmonella flagellins FljC and FljB. *Biochem Biophys Res Commun* **355**, 280-285.
- Simonsen, L., Taylor, R.J., and Kapikian, A.Z.** (2006). Rotavirus vaccines. *N Engl J Med* **354**, 1747-1751; author reply 1747-1751.
- Somers, D.A., and Makarevitch, I.** (2004). Transgene integration in plants: poking or patching holes in promiscuous genomes? *Curr Opin Biotechnol* **15**, 126-131.
- Strasser, R., Castilho, A., Stadlmann, J., Kunert, R., Quendler, H., Gattinger, P., Jez, J., Rademacher, T., Altmann, F., Mach, L., and Steinkellner, H.** (2009). Improved virus neutralization by plant-produced anti-HIV antibodies with a homogeneous {beta}1,4-Galactosylated N-glycan profile. *J Biol Chem* **284**, 20479-20485.
- Streatfield, S.J., and Howard, J.A.** (2003). Plant-based vaccines. *Int J Parasitol* **33**, 479-493.
- Takakura, Y., Che, F.S., Ishida, Y., Tsutsumi, F., Kurotani, K., Usami, S., Isogai, A., and Imaseki, H.** (2008). Expression of a bacterial flagellin gene triggers plant immune responses and confers disease resistance in transgenic rice plants. *Mol Plant Pathol* **9**, 525-529.
- Tallant, T., Deb, A., Kar, N., Lupica, J., de Veer, M.J., and DiDonato, J.A.** (2004). Flagellin acting via TLR5 is the major activator of key signaling pathways leading to NF-kappa B and proinflammatory gene program activation in intestinal epithelial cells. *BMC Microbiol* **4**, 33.
- Vijay-Kumar, M., Aitken, J.D., Sanders, C.J., Frias, A., Sloane, V.M., Xu, J., Neish, A.S., Rojas, M., and Gewirtz, A.T.** (2008). Flagellin treatment protects against chemicals, bacteria, viruses, and radiation. *J Immunol* **180**, 8280-8285.
- Weitkamp, J.H., Lafleur, B.J., and Crowe, J.E., Jr.** (2006). Rotavirus-specific CD5+ B cells in young children exhibit a distinct antibody repertoire compared with CD5- B cells. *Hum Immunol* **67**, 33-42.
- Wen, K., Azevedo, M.S., Gonzalez, A., Zhang, W., Saif, L.J., Li, G., Yousef, A., and Yuan, L.** (2009). Toll-like receptor and innate cytokine responses induced by lactobacilli colonization and human rotavirus infection in gnotobiotic pigs. *Vet Immunol Immunopathol* **127**, 304-315.
- Wigdorovitz, A., Mozgovoij, M., Santos, M.J., Parreno, V., Gomez, C., Perez-Filgueira, D.M., Trono, K.G., Rios, R.D., Franzone, P.M., Fernandez, F., Carrillo, C., Babiuk, L.A., Escribano, J.M., and Borca, M.V.** (2004).

Protective lactogenic immunity conferred by an edible peptide vaccine to bovine rotavirus produced in transgenic plants. *J Gen Virol* **85**, 1825-1832.

Wu, Y.Z., Li, J.T., Mou, Z.R., Fei, L., Ni, B., Geng, M., Jia, Z.C., Zhou, W., Zou, L.Y., and Tang, Y. (2003). Oral immunization with rotavirus VP7 expressed in transgenic potatoes induced high titers of mucosal neutralizing IgA. *Virology* **313**, 337-342.

Yuan, L., Azevedo, M.S., Gonzalez, A.M., Jeong, K.I., Van Nguyen, T., Lewis, P., Iosef, C., Herrmann, J.E., and Saif, L.J. (2005). Mucosal and systemic antibody responses and protection induced by a prime/boost rotavirus-DNA vaccine in a gnotobiotic pig model. *Vaccine* **23**, 3925-3936.